

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Microbiología II**



**BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO  
EXTENDIDO EN “ENTEROBACTERIACEAE”:  
BASES GENÉTICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS DE SU  
DISEMINACIÓN EN DIFERENTES  
COMPARTIMENTOS.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Aránzazu Valverde de Francisco**

Bajo la dirección de los doctores

Rafael Cantón Moreno  
María Teresa Coque González

**Madrid, 2011**

**ISBN: 978-84-694-2891-7**

**© Aránzazu Valverde de Francisco, 2010**



Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología II

**Beta-Lactamasas de Espectro Extendido en  
*Enterobacteriaceae*: Bases Genéticas y Epidemiológicas  
de su Diseminación en Diferentes Compartimentos**

Tesis doctoral presentada por  
**Aránzazu Valverde de Francisco**  
Para la obtención del grado de Doctor

Los directores del trabajo

**Dr. Rafael Cantón Moreno**

**Dra. María Teresa Coque González**

Servicio de Microbiología



Memoria presentada en la Facultad de Farmacia  
de la Universidad Complutense de Madrid  
por Dña. Aránzazu Valverde de Francisco  
para la obtención del grado de doctor

## **Directores**

Dr. Rafael Cantón Moreno. Servicio de Microbiología. CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Hospital Universitario Ramón y Cajal. Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Dra. Teresa Coque González. Servicio de Microbiología. CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Hospital Universitario Ramón y Cajal. Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).



*A mis padres*

*A Marcos*

*Para Pablo*



Toda andadura en la vida tiene su principio y su fin y siempre encontramos personas sin cuyo apoyo y ayuda el viaje nunca llegaría a su destino. Me gustaría agradecer a todos los que en algún momento me han ayudado con su apoyo material o espiritual a llevar a buen puerto esta aventura personal y profesional.

Especialmente, me gustaría agradecer al Dr. Rafael Cantón, director de esta Tesis, el haberme brindado las oportunidades necesarias para realizar este trabajo. Muchas gracias por enseñarme, por el apoyo, el empeño y la paciencia, y por hacerme crecer personal y profesionalmente durante estos años.

A la Dra. Teresa Coque, co-directora de esta Tesis, por sus enseñanzas, su dedicación y sus consejos y la motivación sin los cuales no habría sido posible llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Fernando Baquero, por haberme permitido desarrollarme profesionalmente dentro de su grupo en el apasionante mundo de la microbiología.

Al Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal al completo por acogerme y hacer que este trabajo haya resultado más fácil.

Al Dr. Luis de Rafael por cederme parte de su espacio en los primeros años y por compartir conmigo su conversación y sus gustos musicales.

Al Dr. José Claudio Pérez-Díaz por sus sabios comentarios sobre la ciencia y la vida.

Al Dr. Juan Carlos Galán por sus consejos profesionales y las estupendas charlas vespertinas filosófico-personales.

A mis compañeros los residentes, en especial a las “resis” mayores Patricia, Marta y Elia por su ayuda y los buenos ratos de conversación compartidos. Gracias también a Raquel, parte de cuyo esfuerzo está reflejado en esta Tesis.

A mis compañeros los “becarios” (hoy contratados predoctorales, por fin), Ángela (ya doctora), Aida, Tania, Ana Sofía, Manu y Luis por hacerme comprender que para



avanzar en el mundo científico es fundamental el trabajo en equipo. A Ana Moreno por su predisposición y eficiencia para resolver gestiones y por su sonrisa permanente.

A Merche Rodriguez-Baños por su ayuda, su amistad y sus continuas palabras de cariño.

A mis amigas y compañeras María, Carolina, Carmen Turrientes, Rosa, Marisa, Esther, Feli y Carmen Page por todos los momentos compartidos, las risas, la terapia y sobre todo por vuestra amistad.

A Oscar Salazar por introducirme en el mundo de la biología molecular, por su confianza y por su amistad.

A Tino, gracias por estar siempre ahí, por tu amistad de tantos años y por todo el apoyo en el largo camino hasta el final de esta Tesis.

A mi familia, los que están y los que ya no están, por hacerme sentir tan querida y apoyarme para llegar adónde me proponga.

A mis padres, gracias por educarme como soy, por no haber puesto nunca barreras a mis inquietudes intelectuales y por vuestro apoyo incondicional siempre.

A Marcos, por su dedicación, su paciencia y por compartir conmigo el largo camino de la vida.

A Pablo, gracias por ser la luz de mi vida.

Gracias a todos los que habéis conseguido que el sueño se haga realidad...

## **ÍNDICE**



INTRODUCCIÓN.....	10
1. CLASIFICACIÓN DE LAS BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE).....	3
2. ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE BLEE .....	7
2.1 Enzimas tipo SHV .....	7
2.2 Enzimas tipo TEM .....	9
2.3 Enzimas tipo CTX-M .....	10
2.4 Otras BLEE .....	12
3. EPIDEMIOLOGÍA Y DISEMINACIÓN DE BLEE.....	13
4. DISPERSIÓN DE BLEE .....	16
4.1 Diseminación de clones .....	16
4.2 Diseminación plasmídica de genes <i>bla</i> <sub>BLEE</sub> .....	17
4.3 Secuencias de inserción, transposones e integrones.....	18
5. ASOCIACIÓN CON OTROS MECANISMOS DE RESISTENCIA .....	21
5.1 Resistencia a quinolonas .....	21
5.2 Resistencia a aminoglucósidos.....	22
5.3 Resistencia a carbapenemas .....	22
5.4 Resistencia a otros antimicrobianos.....	23
6. BLEE EN ESPAÑA.....	23
7. BLEE EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL .....	24
OBJETIVOS.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1. MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO DE ENTEROBACTERIAS CON BLEE .....	33
1.1 Muestras de heces de pacientes portadores.....	33
1.2 Muestras de heces de voluntarios sanos portadores .....	33
1.3 Muestras de heces de convivientes de pacientes con infección por enterobacterias con BLEE .....	33
1.4 Muestras ambientales de aguas y alimentos.....	34
1.5 Aislados clínicos productores de BLEE.....	35
1.5.1 <i>Escherichia coli</i> .....	35
1.5.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	35
2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....	36
3. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA Y SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS.....	37
4. TÉCNICAS MOLECULARES .....	38
4.1 Extracción de ADN.....	38
4.1.1 ADN genómico .....	38
4.1.2 ADN plasmídico .....	39
4.2 Digestión de ADN .....	40

4.3 Amplificación de ADN .....	40
4.3.1 Fragmentos de ADN menores de 3Kb .....	41
4.3.2 Fragmentos de ADN mayores de 3Kb .....	41
4.4 Separación de ADN .....	41
4.4.1 Electroforesis en corriente continua .....	41
4.4.2 Electroforesis en corriente alterna o electroforesis de campo pulsado (PFGE) .....	42
4.4.3 Tinción y visualización .....	43
4.5 Purificación y secuenciación de ADN .....	43
4.6 Análisis bioinformático .....	43
4.7 Hibridación .....	44
5. CARACTERIZACIÓN DE BLEE .....	45
5.1 Detección fenotípica .....	45
5.2 Determinación del punto isoelectrico .....	45
5.3 Caracterización de los genes <i>bla</i> <sub>BLEE</sub> .....	46
6. ESTRUCTURA POBLACIONAL .....	48
6.1 Grupos filogenéticos .....	48
6.1.1 <i>E. coli</i> .....	48
6.1.2 <i>K. pneumoniae</i> .....	49
6.2 Electroforesis en geles de campo pulsado (PFGE) .....	51
6.3 Multilocus sequence typing (MLST) .....	51
6.3.1 <i>E. coli</i> .....	51
6.3.2 <i>K. pneumoniae</i> .....	52
7. TRANSFERENCIA DE LOS GENES <i>bla</i> <sub>BLEE</sub> .....	54
7.1 Conjugación en medio sólido .....	54
7.2 Conjugación en medio líquido .....	54
8. LOCALIZACIÓN DE LOS GENES <i>bla</i> <sub>BLEE</sub> .....	55
9. CARACTERIZACIÓN DE LOS ELEMENTOS DE TRANSFERENCIA HORIZONTAL .....	56
9.1 Estudio de plásmidos .....	56
9.1.1 Extracción de plásmidos .....	56
9.1.2 Determinación del número y tamaño .....	56
9.1.3 Análisis del perfil plasmídico .....	56
9.1.4 Determinación de los grupos de incompatibilidad .....	57
9.2 Caracterización del entorno genético de <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> .....	60
9.2.1 Asociación con <i>ISCR1</i> e integrones .....	60
9.2.2 Asociación con <i>ISEcp1</i> .....	61
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	61

RESULTADOS.....	65
1. ESTUDIOS ECOLÓGICOS Y DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE BLEE .....	67
1.1 Epidemiología de enterobacterias productoras de BLEE en portadores fecales de distintos compartimentos .....	67
1.1.1 Prevalencia de portadores fecales.....	67
1.1.2 Caracterización de BLEE.....	71
1.1.3 Estructura poblacional .....	73
1.1.4 Sensibilidad a antibióticos no beta-lactámicos .....	73
1.2. Epidemiología de enterobacterias productoras de BLEE en convivientes de pacientes con infección por estos microorganismos .....	74
1.2.1 Prevalencia de portadores fecales.....	74
1.2.2 Caracterización de BLEE.....	76
1.2.3 Estructura poblacional .....	78
1.2.4 Sensibilidad a antibióticos no beta-lactámicos .....	78
1.3 Epidemiología de enterobacterias productoras de BLEE en aguas y alimentos .....	80
1.3.1 Prevalencia y caracterización de BLEE .....	80
1.3.2 Estructura poblacional .....	80
1.3.3 Sensibilidad a antibióticos no beta-lactámicos .....	80
2. EVOLUCIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> PRODUCTOR DE BLEE.....	81
2.1 Aislados, pacientes y origen de las muestras .....	81
2.2. Caracterización de BLEE .....	84
2.3. Estructura poblacional.....	89
2.3.1 PFGE .....	89
2.3.2 Grupos filogenéticos .....	90
2.3.3 MLST.....	90
2.4. Caracterización de los plásmidos .....	93
2.5 Sensibilidad a antibióticos no beta-lactámicos .....	94
3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE AISLADOS PRODUCTORES DE CTX-M-2, CTX-M-14 Y SHV-12 .....	96
3.1 CTX-M-2.....	96
3.1.1 Características del aislado productor de CTX-M-2 .....	96
3.1.2 Caracterización del entorno genético del gen <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> .....	96
3.2. CTX-M-14.....	98
3.2.1 Aislados, pacientes y origen de las muestras.....	98
3.2.2 Estructura poblacional .....	99
3.2.3 Sensibilidad a antibióticos no beta-lactámicos .....	99
3.2.4 Caracterización de los plásmidos.....	100
Plásmidos del complejo IncI .....	100
Plásmidos del grupo IncHI2.....	102
3.3 SHV-12 .....	108
3.3.1 Aislados, pacientes y origen de las muestras.....	108
3.3.2. Estructura poblacional .....	108
3.3.3 Sensibilidad a antibióticos no beta-lactámicos .....	112

3.3.4 Caracterización de los plásmidos.....	112
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>115</b>
<b>1. AISLADOS PRODUCTORES DE BLEE EN LA COMUNIDAD Y EN EL HOSPITAL.....</b>	<b>119</b>
<b>2. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE <i>K. pneumoniae</i> PRODUCTOR DE BLEE .....</b>	<b>126</b>
<b>3. EPIDEMIOLOGÍA DE CTX-M-2, CTX-M-14 y SHV-12.....</b>	<b>132</b>
3.1 CTX-M-2.....	132
3.2 CTX-M-14 Y SHV-12.....	133
3.2.1 CTX-M-14 .....	134
3.2.2 SHV-12.....	136
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>139</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>143</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>167</b>

## LISTADO DE TABLAS

- Tabla 1.** Clasificación de beta-lactamasas de Bush y cols. (pág 4)
- Tabla 2.** Clasificación de BLEE por Giske y cols. (pág 6)
- Tabla 3.** Diferentes grupos de BLEE. (pág 8)
- Tabla 4.** Cebadores y condiciones para la caracterización de genes *bla*<sub>BLEE</sub>. (pág 47)
- Tabla 5.** Cebadores y condiciones para la caracterización de los grupos filogenéticos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE. (pág 50)
- Tabla 6.** Cebadores y condiciones para la caracterización por MLST de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE. (pág 53)
- Tabla 7.** Cebadores y condiciones para la síntesis de sondas. (pág 55)
- Tabla 8.** Cebadores y condiciones para la caracterización de plásmidos. (pág 58)
- Tabla 9.** Cebadores y condiciones para la caracterización de replicasas y relaxasas del complejo IncI. (pág 59)
- Tabla 10.** Cebadores y condiciones para la caracterización del entorno genético de *bla*<sub>CTX-M-2</sub>. (pág 62)
- Tabla 11.** Cebadores y condiciones para la caracterización de las estructuras genéticas asociadas a *bla*<sub>CTX-M-14</sub>. (pág 64)
- Tabla 12.** Características de los aislados productores de BLEE de muestras fecales (años 1991, 2003 y 2007). (pág 68)
- Tabla 13.** Características de los aislados productores de BLEE de muestras fecales de voluntarios sanos (2003). (pág 71)
- Tabla 14.** Características de los aislados productores de BLEE de los casos índice sin convivientes. (pág 77)
- Tabla 15.** Características de los aislados de *E. coli* productores de BLEE de los casos índice y sus correspondientes convivientes. (pág 78)
- Tabla 16.** Resistencias a antibióticos no beta-lactámicos de los aislados productores de BLEE de los casos índice y sus correspondientes convivientes. (pág 79)
- Tabla 17.** Características de los aislados productores de BLEE de muestras de aguas y alimentos. (pág 80)
- Tabla 18.** Distribución de los aislados clínicos de *K. pneumoniae* productores de BLEE en el Hospital Ramón y Cajal (1989-2006). (pág 83)
- Tabla 19.** Características epidemiológicas de los aislados de *K. pneumoniae* productores de BLEE (2001-2005). (pág 85)
- Tabla 20.** Asociación de tipos de BLEE y grupos filogenéticos en *K. pneumoniae* productores de BLEE. (pág 90)
- Tabla 21.** Análisis mediante MLST de aislados de *K. pneumoniae* productores de BLEE. (pág 92)
- Tabla 22.** Características epidemiológicas de los aislados de *E. coli* productores de CTX-M-14 (2001-2005). (pág 98)
- Tabla 23.** Características de los plásmidos que contienen *bla*<sub>CTX-M-14</sub>. (pág 103)
- Tabla 24.** Características epidemiológicas de los aislados productores de SHV-12 (1999-2005). (pág 110)
- Tabla 25.** Características de los plásmidos que contienen *bla*<sub>SHV-12</sub>. (pág 113)



## LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1.** Dendograma de la familia de enzimas CTX-M. (pág 11)
- Figura 2.** Evolución epidemiológica de BLEE. (pág 14)
- Figura 3.** Representación esquemática de una secuencia de inserción. (pág 19)
- Figura 4.** Representación esquemática de un transposón de clase II. (pág 19)
- Figura 5.** Representación esquemática de un integrón de clase I y de un integrón de clase I inusual. (pág 20)
- Figura 6.** Epidemiología de *E. coli* productor de BLEE en el Hospital Ramón y Cajal (1988-2002). (pág 25)
- Figura 7.** Pacientes con *E. coli* productor de BLEE en el Hospital Ramón y Cajal (1988-2005). (pág 25)
- Figura 8.** Microorganismos productores de BLEE en el Hospital Ramón y Cajal (1988-2005). (pág 26)
- Figura 9.** Muestras de aguas analizadas para la detección de enterobacterias productoras de BLEE. (pág 34)
- Figura 10.** Identificación de los grupos filogenéticos de *E. coli*. (pág 48)
- Figura 11.** Identificación de los grupos filogenéticos de *K. pneumoniae*. (pág 49)
- Figura 12.** Esquema de PCR solapantes para la caracterización del entorno genético de *bla*<sub>CTX-M-2</sub>. (pág 60)
- Figura 13.** Esquema de PCR solapantes para la caracterización del entorno genético de *bla*<sub>CTX-M-14</sub>. (pág 61)
- Figura 14.** Prevalencia de portadores fecales de enterobacterias productoras de BLEE en 1991, 2003 y 2007. (pág 67)
- Figura 15.** Tipos de BLEE obtenidos de muestras fecales de pacientes y voluntarios sanos en los años 2003 y 2007. (pág 72)
- Figura 16.** Aislados resistentes a diferentes antimicrobianos de los años 1991, 2003 y 2007. (pág 74)
- Figura 17.** Porcentaje de portadores fecales en distintos compartimentos. (pág 75)
- Figura 18.** Casos índice portadores de enterobacterias productoras de BLEE y sus correspondientes convivientes. (pág 75)
- Figura 19.** Distribución de BLEE entre muestras clínicas y fecales de los casos índice y los convivientes. (pág 76)
- Figura 20.** Distribución de pacientes con aislados clínicos de *K. pneumoniae* productores de BLEE (pág 82)
- Figura 21.** Distribución de los distintos tipos de BLEE obtenidos de aislados de *K. pneumoniae* (1989-2005). (pág 88)
- Figura 22.** Distribución de BLEE y clones de *K. pneumoniae* (1989-2005). (pág 89)
- Figura 23.** Representación de la estructura poblacional mediante e-BURST de *K. pneumoniae* productor de BLEE. (pág 91)
- Figura 24.** Porcentaje de islados de *K. pneumoniae* productor de BLEE resistentes a diferentes antimicrobianos. (pág 94)
- Figura 25.** Representación esquemática de In117 que contiene a *bla*<sub>CTX-M-2</sub>. (pág 97)
- Figura 26.** Representación de la estructura poblacional mediante e-BURST de *E. coli* productor de CTX-M-14. (pág 100)
- Figura 27.** Alineamiento de las proteínas de replicación de los plásmidos IncI e IncK. (pág 104)
- Figura 28.** Filogenia de las replicasas de los plásmidos IncI e IncK. (pág 105)

#### **LISTADO DE FIGURAS (Continuación)**

**Figura 29.** Alineamiento de las relaxasas de los grupos IncI e IncK de los plásmidos de CTX-M-14. (pág 105)

**Figura 30.** Filogenia de las relaxasas de los plásmidos IncI e IncK del grupo MOB<sub>P12</sub>. (pág 106)

**Figura 31.** Estructura de In60 que contiene al gen *bla*<sub>CTX-M-14b</sub>. (pág 107)

**Figura 32.** Representación de la estructura poblacional mediante e-BURST de *E. coli* productor de SHV-12. (pág 109)

## ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

Ak: Amicacina

Ap: Apramicina

ARN: Ácido Ribonucleico

BLEE: Beta-Lactamasas de Espectro Extendido

CC: Complejo Clonal

Cl: Cloranfenicol

CLSI: *Clinical Laboratories Standard Institute*

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

Cp: Ciprofloxacina

dNTP: Deoxinucleótido Trifosfato

DR: Secuencia Repetida Directa

EBI: *European Bioinformatics Institute*

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

Gm: Gentamicina

IR: Secuencia Repetida e Inversa

Km: Kanamicina

LB: Luria Bertani

MLST: *Multilocus Sequence Typing*

Na: Ácido Nalidíxico

NCBI: *National Center For Biotechnology Information*

Ne: Netilmicina

Nm: Neomicina

PCR: *Polymerase Chain Reaction*; Reacción en Cadena de la Polimerasa

PFGE: *Pulse-Field Gel Electrophoresis*; Electroforesis en geles de campo pulsado

pI: Punto Isoeléctrico

Sm: Estreptomicina

Sp: Espectinomicina

ST: *Sequence Type*; Secuencia Tipo

Su: Sulfonamidas

Tb: Tobramicina

Te: Tetraciclina

Tp: Trimetoprim

U: Unidades de enzima

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

UFC/ml: Unidades Formadoras de Colonia por mililitro

## **INTRODUCCIÓN**



## 1. CLASIFICACIÓN DE LAS BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)

Las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) se han definido tradicionalmente como enzimas capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas incluyendo las de amplio espectro y monobactams, pero no cefamicinas ni carbapenemas. Estas enzimas pueden ser inactivadas por compuestos como el ácido clavulánico o el sulbactam (Philippon y cols., 1989).

Las beta-lactamasas se han clasificado utilizando diferentes criterios; esencialmente su estructura molecular (clasificación de Ambler) y sus características enzimáticas (clasificación según Bush, Jacoby y Medeiros):

- i) la clasificación molecular de Ambler (Ambler y cols., 1980) divide a las beta-lactamasas en cuatro clases (A, B, C y D) basándose en la estructura de la proteína. Las enzimas de los grupos A, C y D son serin-beta-lactamasas, que contienen una serina en su centro activo, y las del grupo B son metalo-beta-lactamasas, dependientes de  $Zn^{+2}$ .
- ii) la clasificación funcional propuesta por Bush, Jacoby y Medeiros en 1995 y actualizada en 2009 (Bush y cols., 1995; Bush y cols., 2010) establece diferentes grupos según su sustrato y el perfil de inhibición por inhibidores de beta-lactamasas (Tabla 1):
  - a. El grupo 1 incluye enzimas de la clase C de Ambler que hidrolizan cefalosporinas y no son inhibidas por el ácido clavulánico o tazobactam.
  - b. El grupo 2 incluye enzimas de las clases A y D de Ambler que se inhiben por el ácido clavulánico y está compuesto por 12 subgrupos.
  - c. El grupo 3 incluye enzimas de la clase B de Ambler. Son metalo-beta-lactamasas que requieren para actuar de la unión de  $Zn^{+2}$  a su centro activo y que se inhiben por agentes quelantes como el EDTA, pero que no se inhiben por el ácido clavulánico o por tazobactam.
  - d. El grupo 4, incluido en la clasificación inicial, no aparece en la actualización del año 2010. La mayoría enzimas incluidas inicialmente en este grupo no están completamente caracterizadas y podrían ser clasificadas en los grupos anteriores.

**Tabla 1.** Clasificación de beta-lactamasas (Adaptado de Bush y cols., 1995; Bush y cols., 2010).

Bush-Jacoby (2010)	Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Ambler (1980)	Sustrato preferencial	Inhibidos por:			Características	Beta-lactamasas representativas	Localización	Microorganismos
				CLAV	TZB	EDTA				
1	1	C	Cefalosporinas	No	No	No	Mayor hidrólisis de cefalosporinas que de bencilpenicilinas. Hidrólisis de cefamandolam	AmpC, P99, AACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1	Cromosómica/Plasmídica	Enterobacterias, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1e	NI	C	Cefalosporinas	No	No	No	Hidrólisis elevada de ceftazidima y de otros oximino-beta-lactámicos	GCI, CMY-37	Cromosómica/Plasmídica	Enterobacterias
2a	2a	A	Penicilinas	Sí	No	No	Mayor hidrólisis de bencilpenicilinas que de cefalosporinas	PCI	Cromosómica/Plasmídica	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Citrobacter amalonaticus</i>
2b	2b	A	Penicilinas, cefalosporinas 1ª generación	Sí	No	No	Hidrólisis similar de bencilpenicilinas y de cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Cromosómica/Plasmídica	Enterobacterias, <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
2be	2be	A	Cefalosporinas 1ª-4ª generación, monobactam	Sí	No	No	Hidrólisis elevada de oximino-beta-lactámicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1	Cromosómica/Plasmídica	Enterobacterias, <i>P. aeruginosa</i>
2br	2br	A	Penicilinas	No	No	No	Resistentes a ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-30, SHV-10	Plasmídica	<i>Escherichia coli</i>
2ber	NI	A	Cefalosporinas 1ª-4ª generación, monobactam	No	No	No	Hidrólisis elevada de oximino-beta-lactámicos y resistencia a clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-50	Plasmídica	Enterobacterias
2c	2c	A	Carbencilina	Sí	No	No	Hidrólisis elevada de carbencilina	PSE-1, CARB-3	Cromosómica/Plasmídica	<i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i>

Tabla 1. Continuación.

Bush-Jacoby (2010)	Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Ambler (1980)	Sustrato preferencial	Inhibidos por:		Características	Beta-lactamasas representativas	Localización	Microorganismos
				CLAV	TZB	EDTA			
2ce	NI	A	Carbenicilina, cefepima	Sí	No	No	Hidrólisis elevada de carbenicilina, cefepima, y cefpiroma	RTG-4	Plasmídica <i>Acinetobacter baumannii</i>
2d	2d	D	Cloxacilina	Variable	No	No	Hidrólisis elevada de cloxacilina y oxacilina	OXA-1, OXA-10	Cromosómica/ Plasmídica Enterobacterias, <i>P. aeruginosa</i>
2de	NI	D	Cefalosporinas 1 <sup>a</sup> -4 <sup>a</sup> generación	Variable	No	No	Hidrólisis de cloxacilina, oxacilina y oximino-beta-lactámicos	OXA-11, OXA-15	Plasmídica Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i>
2df	NI	D	Carbapenemas	Variable	No	No	Hidrólisis de cloxacilina, oxacilina y carbapenemas	OXA-23, OXA-48	Cromosómica/ Plasmídica Enterobacterias, <i>A. baumannii</i>
2e	2e	A	Cefalosporinas 1 <sup>a</sup> -4 <sup>a</sup> generación	Sí	No	No	Hidrólisis de cefalosporinas. Inhibición por ácido clavulánico pero no por aztreonam	CepA	Cromosómica/ Plasmídica <i>Bacteroides</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i>
2f	2f	A	Carbapenemas	Variable	No	No	Hidrólisis elevada de carbapenemas, oximino-beta-lactámicos y cefamandinas	KPC-2, IMI-1, SME-1	Cromosómica/ Plasmídica <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>K. pneumoniae</i>
3a	3	B (subgrupo B1 y B3)	Carbapenemas	No	Sí	Sí	Hidrólisis de amplio espectro que incluye carbapenemas pero no monobactámicos	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, LI, CAU-1, GOB-1, FEZ-1	Cromosómica/ Plasmídica Enterobacterias, <i>P. aeruginosa</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
3b	3	B (subgrupo B2)	Carbapenemas	No	Sí	Sí	Hidrólisis de carbapenemas	CphA, Sfh-1	Cromosómica <i>Aeromonas</i> spp.
NI	4	Desconocido	Penicilinas	No	Desconocido	Desconocido	Desconocidas	Penicilinas	Cromosómica <i>Burkholderia cepacia</i>

NI: No incluido. CLAV: ácido clavulánico. TZB: tazobactam. EDTA: ácido etilendiaminotetraacético



Recientemente, Giske y cols. (Giske y cols., 2009) han propuesto una clasificación para facilitar el control epidemiológico de las BLEE (Tabla 2) y acoger bajo el término de BLEE a las cefamicinasas o beta-lactamasas AmpC plasmídicas y las carbapenemasas transferibles. Se establecen así tres grupos: BLEE<sub>A</sub>, BLEE<sub>M</sub> y BLEE<sub>CARBA</sub> con diferentes subclases cada uno, de acuerdo con sus características fenotípicas. El grupo BLEE<sub>A</sub> agrupa a las beta-lactamasas de clase 2be, donde se encuentran las BLEE más prevalentes (TEM, SHV y CTX-M). El grupo BLEE<sub>M</sub> engloba, entre otras a las AmpC plasmídicas y las BLEE tipo OXA. El grupo BLEE<sub>CARBA</sub> está compuesto por carbapenemasas, incluyendo las metalo-beta-lactamasas y serin-beta-lactamasas con actividad hidrolítica frente a carbapenemas.

**Tabla 2.** Clasificación de BLEE propuesta por Giske y cols. (Adaptado de Giske y cols., 2009).

<b>Beta-lactamasas con actividad hidrolítica frente a cefalosporinas de espectro extendido y carbapenemas</b>			
<b>Tipos de beta-lactamasas</b>	BLEE <sub>A</sub>	BLEE <sub>M</sub>	BLEE <sub>CARBA</sub>
	BLEE <sub>A</sub> Alta prevalencia CTX-M, TEM, SHV, VEB, PER	BLEE <sub>M-C</sub> (AmpC plasmídicas) CMY, FOX, MIR, MOX, DHA, LAT, BIL, ACT, ACC	BLEE <sub>CARBA-A</sub> KPC, GES-2, -4,-5,-6,-8, NMC, SME, IMI-1,-2
	BLEE <sub>A</sub> Baja prevalencia GES-1, -3,-7,-9, SFO-1, BES-1, BEL-1, TLA, IBC, CMT <sup>a</sup>	BLEE <sub>M-D</sub> (OXA-BLEE) Grupo OXA-10 Grupo OXA-13 Grupo OXA-2 OXA-18, OXA-45	BLEE <sub>CARBA-B</sub> (metalo- beta-lactamasas) IMP, VIM, SPM-1 GIM-1, SIM-1, AIM-1  BLEE <sub>CARBA-D</sub> (OXA- carbapenemasas) Grupo OXA-23 Grupo OXA-24 OXA-48 <sup>b</sup> , Grupo OXA-58
<b>Características</b>	Resistentes a cefalosporinas de espectro extendido. Sinergia con ácido clavulánico	Resistentes a cefalosporinas de espectro extendido. Detección fenotípica (BLEE <sub>M-C</sub> ) y genotípica (BLEE <sub>M-D</sub> )	Resistentes a cefalosporinas de espectro extendido y al menos a una carbapenema. BLEE <sub>CARBA</sub> detectadas con métodos fenotípicos y/o genotípicos

**a.** Resistente a ácido clavulánico. **b.** Los aislados productores de OXA-48 pueden presentar sensibilidad *in vitro* a las cefalosporinas.

## 2. ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE BLEE

Las BLEE incluyen enzimas pertenecientes a la clase A de Ambler y funcionalmente al grupo 2be y enzimas de la familia de las OXA que pertenecen a la clase D de Ambler y al grupo funcional 2de (Tabla 1) y se clasifican según su secuencia de aminoácidos en diferentes familias. Aunque existen diferencias en la prevalencia de los distintas familias, las mayoritarias son las de tipo TEM, SHV y CTX-M, seguidas de OXA, PER y VEB. Otras BLEE aisladas menos frecuentemente son SFO, TLA, GES, IBC y BEL (Tabla 3). Estas enzimas derivan de genes de beta-lactamasas cromosómicas por mutaciones y movilización e integración de los mismos en diferentes estructuras genéticas, siendo la mayoría de ellas de codificación plasmídica (Barlow y cols., 2008; Cantón, 2008a).

### 2.1 Enzimas tipo SHV

Las enzimas de tipo SHV (Sulfhidrilo Hidroxil Variable) derivan de la beta-lactamasa cromosómica de *K. pneumoniae* SHV-1 (Paterson y cols., 2005). La primera BLEE de este tipo, que también fue la primera BLEE descrita, se detectó en 1983 en Alemania en un aislado de *Klebsiella ozaenae* que presentaba un fenotipo de resistencia poco habitual y que se transfería por conjugación. Se trataba de la variante SHV-2 que difería de su predecesor SHV-1 en una mutación aminoácidica (Knothe y cols., 1983).

Hasta el momento se han descrito 134 variantes de SHV ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)), siendo la mayoría de ellas BLEE, aunque también existen variantes que muestran resistencia variable a inhibidores de beta-lactamasas de clase A (SHV-10, 26, 49, 56 y 72).

Se han detectado en diferentes especies de enterobacterias, principalmente en *E. coli* y *K. pneumoniae* aunque también en *P. aeruginosa* y en *Acinetobacter* spp. (Paterson y cols., 2005).

La movilización del gen cromosómico *bla*<sub>SHV-1</sub> del que derivan los diferentes genes *bla*<sub>SHV</sub> está asociada a la secuencia de inserción IS26 (Ford y cols., 2004).

Tabla 3. Diferentes grupos de beta-lactamasas de espectro extendido (Adaptado de Cantón y cols., 2007).

BLEE	Beta-lactamasa relacionada	Especie de origen y homología	Origen geográfico y temporal	Especies en las que se detectaron inicialmente
Alta prevalencia				
SHV	SHV-1/LEN (>90%) <sup>a</sup>	<i>Klebsiella</i> spp.	Alemania (1983) <sup>b</sup>	Enterobacterias
TEM	TEM-1, -2 (>90%) <sup>a</sup>	ND	Francia (1985) <sup>b</sup>	Enterobacterias
Grupo CTX-M-1	KLUC (100%) <sup>a</sup>	<i>Kluyvera ascorbata</i>	Alemania (1989) <sup>c</sup>	<i>E. coli</i>
Grupo CTX-M-2	KLUA (80-100%) <sup>a</sup>	<i>K. ascorbata</i>	Japón (1986) <sup>c</sup> / Argentina (1989) <sup>c</sup>	<i>E. coli, Salmonella</i> spp.
Grupo CTX-M-8	KLUG (95%) <sup>a</sup>	<i>Kluyvera georgiana</i>	Brasil (1996-97) <sup>c</sup>	<i>C. amalonaticus, Enterobacter</i> spp.
Grupo CTX-M-9	KLUG (80%) <sup>a</sup>	<i>K. georgiana</i>	España (1994) <sup>c</sup>	<i>E. coli</i>
Grupo CTX-M-25	ND	ND	Canadá (2000) <sup>c</sup>	<i>E. coli</i>
OXA	OXA-10 (PSE-2) (>90%) <sup>a</sup>	ND	Turquía (1991) <sup>c</sup>	<i>P. aeruginosa</i>
PER	ND	ND	Francia (1991) <sup>c</sup> (Turquía) <sup>d</sup>	<i>P. aeruginosa</i>
VEB	PER (39%) <sup>a</sup>	ND	Francia (1996) <sup>c</sup> (Vietnam) <sup>d</sup>	<i>E. coli</i>
Baja prevalencia				
SFO	AmpA (96%) <sup>a</sup>	<i>Serratia fonticola</i>	Japón (1988) <sup>c</sup>	<i>E. cloacae</i>
TLA	CME-1 (50%) <sup>a</sup>	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	Méjico (1991) <sup>c</sup>	<i>E. coli</i>
BES	YENT (51%) <sup>a</sup>	<i>Yersinia enterocolitica</i> .	Brasil (1996) <sup>c</sup>	<i>S. marcescens</i>
GES-1	YENT (36%) <sup>a</sup>	<i>Y. enterocolitica</i>	Francia (1998) <sup>c</sup> (Guayana francesa) <sup>d</sup>	<i>K. pneumoniae</i>
IBC	YENT (40%) <sup>a</sup>	<i>Y. enterocolitica</i>	Grecia (1999) <sup>c</sup>	<i>E. cloacae</i>
BEL	GES-1 (50%) <sup>a</sup>	ND	Bélgica (2004) <sup>c</sup>	<i>P. aeruginosa</i>

ND. No determinado. a. Porcentaje de homología de aminoácidos. b. Fecha de aislamiento. c. Fecha de publicación. d. País de origen del paciente.

## 2.2 Enzimas tipo TEM

Las BLEE de tipo TEM son derivados de TEM-1 y TEM-2 (Novais y cols., 2010), aunque su origen es desconocido. La enzima TEM-1 se describió por primera vez en 1965 en Grecia en un aislado de *Escherichia coli* procedente de un paciente llamado Temoniera, de ahí la denominación de TEM (Datta y cols., 1965). TEM-1 hidroliza penicilinas y cefalosporinas de primera generación como cefazolina pero no exhibe actividad frente a beta-lactámicos de amplio espectro, siendo inhibida por el ácido clavulánico. La enzima TEM-2 se describió en 1972 y se diferencia de TEM-1 en una mutación puntual en la posición 39 (Lys-Gln) lo que confiere un cambio en su punto isoeléctrico pero no en la actividad hidrolítica (Barthélémy y cols., 1985).

En 1984 se describió en Francia, en distintos aislados de *K. pneumoniae*, la primera BLEE tipo TEM inicialmente denominada CTX-1, que posteriormente se nombró como TEM-3, que presentaba dos mutaciones respecto a TEM-2 y que se encontraba en un plásmido conjugativo del grupo de incompatibilidad IncL/M (Novais y cols., 2010; Sirot y cols., 1987; Sougakoff y cols., 1988). Hasta el momento se han descrito 182 variantes que incluyen también las enzimas IRT (Inhibitor-Resistant TEM), que son enzimas de amplio espectro resistentes a los inhibidores de beta-lactamasas, y las CMT (Complex Mutant TEM) que son enzimas que combinan los perfiles de BLEE e IRT ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)).

La mayoría de estas enzimas se ha descrito en *E. coli* y *K. pneumoniae*, aunque también se han identificado en otras especies de enterobacterias como *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* y *Salmonella* spp. y también en *Pseudomonas aeruginosa* (Bradford, 2001).

Las enzimas TEM derivan de los genes *bla*<sub>TEM</sub> que se encuentra localizados en derivados de Tn3 (*bla*<sub>TEM-1a</sub>), Tn2 (*bla*<sub>TEM-1b</sub>) y Tn1 o Tn801 (*bla*<sub>TEM-2</sub>) (Novais y cols., 2010).

### 2.3 Enzimas tipo CTX-M

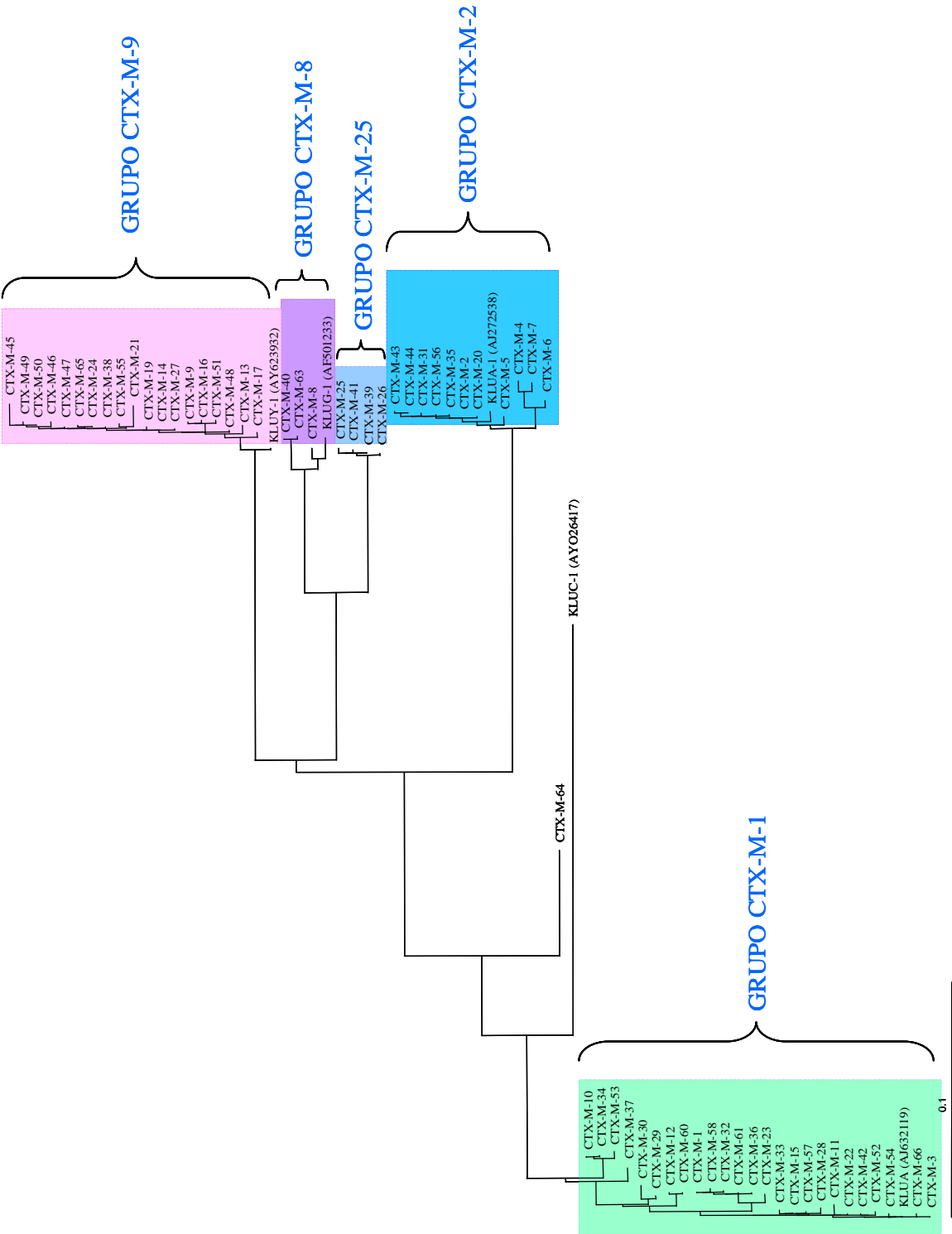
Las enzimas de tipo CTX-M se dividen según su secuencia de aminoácidos en cinco grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25 (Figura 1; [www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies); Cantón y cols., 2006; Rossolini y cols., 2008). Tienen una gran actividad hidrolítica frente a cefotaxima y algunas de sus variantes también hidrolizan ceftazidima.

Las BLEE de tipo CTX-M derivan de beta-lactamasas cromosómicas de distintas especies de *Kluyvera*. El origen de los grupos CTX-M-1 y CTX-M-2 parece estar en genes de *Kluyvera ascorbata* y los grupos CTX-M-8 y CTX-M-9 habrían evolucionado a partir de genes de *Kluyvera georgiana*. El origen del grupo CTX-M-25 no se ha identificado de forma precisa pero se cree que también podría derivar de otros miembros del género *Kluyvera* (Rodríguez y cols., 2004; Rossolini y cols., 2008; Olson y cols., 2005).

En 1986, se describió en Japón una cepa de *E. coli* resistente a cefotaxima procedente de las heces de un perro de laboratorio, en la que se caracterizó la beta-lactamasa FEC-1 (Matsumoto y cols., 1988). Posteriormente, en 1989, se describió en Alemania una cepa de *E. coli* con un fenotipo similar a FEC-1 que producía una BLEE y se designó como CTX-M-1, el nombre proviene de su elevada actividad hidrolítica frente a la cefotaxima y a que el primer aislado se obtuvo en la ciudad de Munich, (Bauernfeind y cols., 1990). Simultáneamente en Argentina se describió la enzima CTX-M-2 en cepas de *Salmonella typhimurium* (Bauernfeind y cols., 1992). En 1996, se detectó el primer aislado productor de CTX-M-8 en Brasil (Bonnet y cols., 2000a) y en 1994 el primer aislado de *E. coli* productor de CTX-M-9 en Francia.

Se han caracterizado hasta el momento 100 variantes de CTX-M ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)) en diferentes especies de enterobacterias y ampliamente diseminadas tanto en el compartimento hospitalario como en la comunidad y distribuidas por todo el mundo, constituyendo en la actualidad el grupo más prevalente de BLEE (Cantón y cols., 2006).

La movilización de los genes cromosómicos de los que derivan los distintos tipos de CTX-M, parece haberse producido a través de secuencias de inserción como *ISEcp1* o *ISCR1*, o secuencias relacionadas con bacteriófagos (Oliver y cols., 2005; Rossolini y cols., 2008; Toleman y cols., 2006). En algunos casos los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> se han asociado a IS26, aunque no existen estudios que asocien directamente a esta secuencia de inserción con eventos de movilización (Cullik y cols., 2010; Literacka y cols., 2009).



**Figura 1.** Dendrograma de la familia de enzimas CTX-M construido mediante el método neighbor-joining (NJ) basado en una matriz de distancias obtenida usando el modelo de sustitución nucleotídica Kimura-2 parámetros a partir de 68 secuencias de aminoácidos. La barra inferior indica los nucleótidos sustituidos por cada 100 nucleótidos.

## 2.4 Otras BLEE

Las beta-lactamasas de tipo OXA se caracterizan por su gran actividad hidrolítica frente a oxacilina, ampicilina y cefalotina y por no ser apenas inhibidas por el ácido clavulánico. La primera OXA tipo BLEE (OXA-11) deriva de OXA-10 y fue descrita de una muestra de sangre de un paciente de Turquía en un aislado de *P. aeruginosa* (Hall y cols., 1993). En la actualidad hay descritas 11 variantes de OXA con perfil de BLEE ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)). Se han identificado mayoritariamente en *P. aeruginosa*, y también en *Acinetobacter baumannii* y en diferentes especies de enterobacterias (Naas y cols., 2008).

Las BLEE de la familia PER presentan sólo un 25% de homología con las enzimas tipo TEM y SHV. Confiere resistencia a penicilinas, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam. Su actividad se inhibe por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Hasta la fecha, se han descrito 6 variantes de enzimas tipo PER ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)).

La enzima PER-1 se describió por primera vez en Francia en 1991 de un aislado de un paciente originario de Turquía. Está muy diseminada en *Acinetobacter* spp. y en *P. aeruginosa*. PER-2, que presenta un 86% de homología en aminoácidos con PER-1, fue descrita por primera vez en cepas de *S. enterica* serovar Thyphimurium en 1996 en Argentina (Bauernfeind y cols., 1996) y posteriormente en otras especies de bacterias Gram-negativas. Es reseñable que mientras PER-1 se ha descrito principalmente en Turquía y Corea, PER-2 sólo se ha encontrado en América del Sur (Naas y cols., 2008).

La primera enzima descrita de tipo VEB (VEB-1) presenta una homología de secuencia de aminoácidos con PER-1 y PER-2 del 38,0%. Confiere resistencia a ceftazidima, cefotaxima y aztreonam y se inhibe por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam y también por imipenem y cefoxitina. La primera descripción se hizo en 1996 en un aislado de *E. coli* en Francia de un paciente vietnamita (Poirel y cols., 1999). Hasta el momento se han descrito 7 variantes diferentes de este tipo de enzimas ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)).

Las BLEE de tipo GES (también denominadas IBC) presentan un perfil hidrolítico similar a otras BLEE de clase A de Ambler, es activa frente a penicilinas y cefalosporinas de amplio espectro, pero no frente a cefamicinas o carbapenemas y es inhibida por el ácido clavulánico, tazobactam e imipenem. La primera BLEE de este grupo, denominada GES-1, se describió por primera vez en *K. pneumoniae* en Francia (Poirel y cols., 2000). En la actualidad se han descrito 16 variantes ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)), identificadas en países de distintos continentes como Argentina, Brasil, China, Corea, Japón, Francia, Grecia, Portugal y

Sudáfrica (Mendonça y cols., 2009; Naas y cols., 2008; Piersigilli y cols., 2009). Se han diseminado de manera creciente en *P. aeruginosa*, *E. coli* y *K. pneumoniae*.

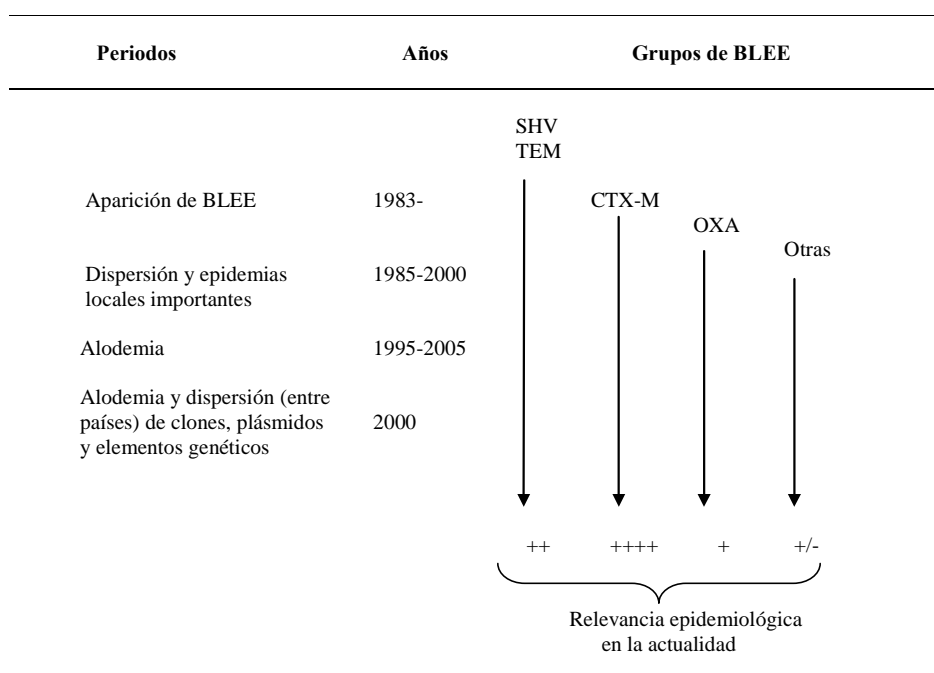
Otras BLEE de menor prevalencia son SFO, TLA, BEL y BES, descritas de manera esporádica en diferentes países (Matsumoto y cols., 1999; Bonnet y cols., 2000b; Poirel y cols., 2005; Silva y cols., 2000, Naas y cols., 2008).

### 3. EPIDEMIOLOGÍA Y DISEMINACIÓN DE BLEE

La epidemiología de las BLEE ha sufrido cambios notables desde la descripción del primer aislado productor de estas enzimas en 1983 (Figura 2). En un principio, la mayoría de las BLEE descritas eran de tipo TEM o SHV. Los aislados productores de estas enzimas estaban asociados principalmente a brotes nosocomiales, esencialmente en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) y la prevalencia de *K. pneumoniae* era mucho más elevada que la de *E. coli*. Los factores de riesgo incluían la estancia en UCI, cirugía reciente, utilización de catéteres, tiempos prolongados de hospitalización y uso previo de cefalosporinas y/o aminoglucósidos (Cantón y cols., 2008b). En los últimos años la gran mayoría de los aislados productores de BLEE son *E. coli* con CTX-M que proceden de pacientes de la comunidad y principalmente causantes de infecciones del tracto urinario. Estos aislados presentan una epidemiología compleja debida no sólo a la diseminación de clones ampliamente distribuidos, sino también de plásmidos y su asociación con otros elementos genéticos (Cantón y cols., 2006; Coque y cols., 2008a; Paterson y cols., 2005).

Diferentes estudios de vigilancia epidemiológica muestran más prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE en Latinoamérica o en la región Asia-Pacífico que en Europa o América. Estos estudios también ponen de manifiesto las diferencias en la distribución de *K. pneumoniae* y *E. coli*, reflejando una mayor prevalencia de *K. pneumoniae* en Asia y en Sudamérica, y una distribución más uniforme de *E. coli* entre los distintos continentes (Coque y cols., 2008a; Reinert y cols., 2007; Winokur y cols., 2001).





**Figura 2.** Evolución epidemiológica de las BLEE desde su primera descripción hasta la actualidad. (Adaptado de Cantón y cols., 2007). Alodemia se define como el aumento de un determinado carácter en una población debido a la aparición de múltiples caracteres (Baquero y cols., 2002).

Las diferencias epidemiológicas entre estos dos microorganismos se hacen más patentes en el caso de pacientes hospitalizados y con factores de riesgo de colonización por este tipo de microorganismos. Así, *K. pneumoniae* presenta una mayor diseminación clonal, frecuentemente en UCI y unidades de neonatos, donde los pacientes tienen una mayor facilidad para adquirir microorganismos multiresistentes (Ben-Hamouda y cols., 2004; Laurent y cols., 2008; Peña y cols., 2001; Velasco y cols., 2009). Estos pacientes están sometidos a diversas manipulaciones y a una mayor presión antibiótica lo que aumenta el riesgo de selección de cepas resistentes y la presión de colonización en las unidades. El género *Klebsiella*, por sus características especiales, está bien adaptado al medio hospitalario ya que puede sobrevivir más que otras especies en las superficies o en las manos del personal hospitalario, facilitando las infecciones cruzadas dentro de un hospital (Casewell y cols., 1981). Se han descrito brotes hospitalarios asociados a enzimas del tipo SHV (SHV-4 o SHV-5; Arlet y cols., 1994; Briñas y cols., 2004), del tipo TEM (TEM-68; Fiett y cols., 2000) y más recientemente a CTX-M-15 (Carrër y cols., 2009; Damjanova y cols., 2008).

Los aislados de *E. coli* productor de BLEE presentan una epidemiología más compleja que los de *K. pneumoniae* con brotes epidémicos causados por clones productores de determinadas BLEE, como CTX-M-15 (Naseer y cols., 2007) o diseminaciones clonales asociadas en algunos casos a plásmidos altamente transmisibles (Novais y cols., 2006; Peña y cols., 2006; Rodríguez-Baño y cols., 2006).

En los últimos años, el aumento de la prevalencia de *E. coli* productor de BLEE en la comunidad ha sido más que notable, sobre todo asociado a las enzimas de tipo CTX-M. En algunos de estos casos, están relacionados con brotes comunitarios como el caso de Canadá y CTX-M-14 o en el Reino Unido asociado a CTX-M-15 (Pitout y cols., 2005a; Woodford y cols., 2004). Este aumento también se ha puesto de manifiesto en estudios realizados en residencias de ancianos o instituciones sanitarias de larga estancia lo que facilita la diseminación de estos aislados dentro del hospital cuando los pacientes son ingresados y están colonizados por microorganismos productores de BLEE (Oteo y cols., 2006; Romero y cols., 2005). Otros trabajos revelan la presencia de enterobacterias productoras de BLEE en la comunidad clonalmente relacionadas con aislados de brotes hospitalarios, donde los pacientes habían sido previamente ingresados (Arpin y cols., 2005; Woodford y cols., 2007). La entrada de microorganismos productores de BLEE desde la comunidad al hospital también se ha detectado en pacientes sin contacto previo con el hospital. En un estudio llevado a cabo por Ben-Ami y cols. en 2006 se demuestra que los portadores fecales de enterobacterias productoras de BLEE antes del ingreso tienen más riesgo de desarrollar bacteriemias por el mismo microorganismo durante su estancia hospitalaria (Ben-Ami y cols., 2006). El hecho de que los portadores fecales puedan representar un potencial reservorio para estas bacterias queda reflejado en distintos estudios llevados a cabo en portadores sanos donde se refleja un aumento en la prevalencia de estos aislados a lo largo del tiempo (Castillo y cols., 2007; Miró y cols., 2005; Valverde y cols., 2004; Woerther y cols., 2010). Estos porcentajes podrían no reflejar la situación de la población general, puesto que hay que tener en cuenta el consumo previo de antibióticos en muchos casos y el contacto con microorganismos multirresistentes del hospital. En los estudios donde se analiza la prevalencia de portadores fecales de enterobacterias productoras de BLEE en voluntarios sanos, las cifras de colonización son menores que en el caso de pacientes, como en niños de Latinoamérica sin exposición previa ni contacto sanitario con ningún centro, trabajadores sanitarios y estudiantes en el Líbano o voluntarios sanos de España, Arabia Saudí y la Guayana Francesa (Kader y cols., 2007;

Moubareck y cols., 2005; Pallecchi y cols., 2007; Valverde y cols., 2004; Woerther y cols., 2010).

Las enterobacterias productoras de BLEE son también frecuentemente aisladas de muestras medioambientales y en animales. Distintos trabajos muestran la prevalencia de estos microorganismos en muestras de aguas y de alimentos (Jouini y cols., 2007; Machado y cols., 2009; Mesa y cols., 2006, Prado y cols., 2008) y también su posible transmisión a través de la cadena alimentaria (Lavilla y cols., 2008a; Prats y cols., 2003). Varios autores han documentado la presencia aislados productores de BLEE en animales de distintos orígenes, ya sean de granja, de vida libre o mascotas. En todos ellos se muestra un aumento de los mismos, especialmente aquellos con enzimas del tipo CTX-M (Carattoli, 2008; Ewers y cols., 2010; Sun y cols., 2009; Torres y cols., 2007).

#### **4. DISPERSIÓN DE BLEE**

El incremento experimentado en los últimos años en el número de aislados productores de BLEE puede estar asociado a la diseminación de clones ampliamente distribuidos, la asociación con otros genes de resistencia, favoreciendo así los procesos de coselección, y la presencia de estos genes en diferentes plataformas genéticas de transferencia horizontal como secuencias de inserción, transposones y plásmidos que facilitarían su dispersión.

##### **4.1 Diseminación de clones**

Uno de los factores responsables del aumento de enterobacterias productoras de BLEE es la diseminación clonal. Uno de los casos más representativos en cuanto a la rápida diseminación por distintos países es la que se ha producido con el clon B2-*E. coli* O25:H4-ST131, en general resistente a ciprofloxacino, que causa infecciones del tracto urinario y que se ha asociado con la pandemia de CTX-M-15. Este clon se ha detectado en diferentes países como Canadá, España, Francia, Grecia, Italia, Noruega, Portugal, Suiza y Turquía (Coque y cols., 2008b; Pitout y cols., 2009) y es capaz de adquirir distintos elementos genéticos y genes de resistencia y se ha detectado en aislados no productores de BLEE obtenidos de voluntarios sanos (Lau y cols., 2008a; Leflon-Guibout y cols., 2008; Oteo y cols., 2009a; Pitout y cols., 2009). Otros linajes son responsables de la diseminación de determinadas BLEE, como el caso de A- *E. coli*-ST10 o B1-*E. coli*-ST359 o ST155, que se identifican principalmente entre los productores de CTX-M-14 en España (Valverde y cols., 2009).

En el caso de *K. pneumoniae* productor de BLEE, distintos trabajos exponen la presencia de clones epidémicos entre diferentes países (Hrabák y cols., 2009; Kassis-Chikhani y cols., 2006). Las diseminaciones a nivel nacional de clones determinados han sido también descritas en varios estudios. En Grecia, una cepa productora de SHV-5 que se detectó por primera vez en los años 90, en la actualidad ha adquirido también una VIM-1. Este clon se ha diseminado en distintos hospitales griegos y en Francia (Kassis-Chikhani y cols., 2006; Psychogiou y cols., 2008). En Hungría los brotes epidémicos de las UCI neonatales se han producido por cepas de *K. pneumoniae* productoras de SHV-5 y SHV-2a (Damjanova y cols., 2007). Recientemente, se ha descrito en este país la diseminación de los clones ST11, ST15 y ST147 de *K. pneumoniae* productoras de CTX-M-15, resistentes a ciprofloxacino en UCI de diferentes hospitales del país (Damjanova y cols., 2008). En otros casos, se ha descrito la persistencia durante varios años de clones de *K. pneumoniae* productor de BLEE en instituciones concretas como el caso de Francia (TEM-24) o España (TEM-4, SHV-12) (Coque y cols., 2002; Giraud-Morin y cols., 2003; Valverde y cols., 2008a).

Esta diseminación clonal también se produce en otras especies de enterobacterias como en el caso del clon de *E. aerogenes* productor de TEM-24 ampliamente diseminado en hospitales de Bélgica, Francia, Portugal y España desde 1990 (Coque y cols., 2008a; Novais y cols., 2010). Otro clon de *E. cloacae* con un plásmido conjugativo portador de los genes *qnrA1*, *bla*<sub>CTX-M-9</sub> y *aadB* se ha detectado en 11 de 15 hospitales holandeses y ha causado brotes en al menos 4 de ellos (Paauw y cols., 2007). En diferentes países también se han detectado clones causantes de brotes hospitalarios de especies como *P. mirabilis* (TEM-24) (Biendo y cols., 2005; Novais y cols., 2010), *Shigella sonnei*, *S. marcescens* (CTX-M-3) (Ivanova y cols., 2008) y *K. oxytoca* (SHV-5 y TEM-7) (Decré y cols., 2004; Venezia y cols., 1995).

#### 4.2 Diseminación plasmídica de genes *bla*<sub>BLEE</sub>

Los genes *bla*<sub>BLEE</sub> se localizan frecuentemente en plásmidos conjugativos que pertenecen a grupos de incompatibilidad clásicos (Carattoli, 2009; Coque y cols., 2008a; Couturier y cols., 1988; Datta y cols., 1983). Estos plásmidos pueden tener distinto rango de hospedador, lo que determina su diseminación en diferentes especies. Los grupos de incompatibilidad más prevalentes son IncI, IncF, IncK, IncA/C e IncN capaces de vehicular BLEE de distintas clases y familias (Carattoli, 2009). Estos plásmidos se describieron en los primeros aislados

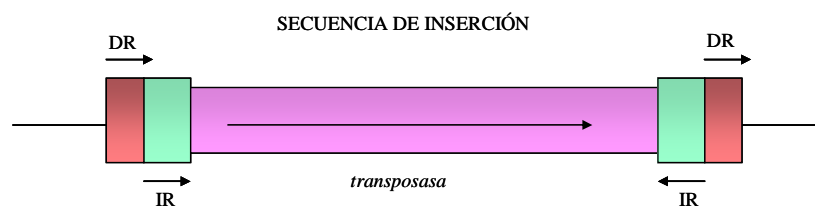
resistentes a antibióticos, lo que sugiere una evolución de los mismos mediante la adquisición de nuevos genes de resistencia asociados a diferentes elementos genéticos como secuencias de inserción, integrones o transposones (Cantón y cols., 2006).

Conocer la naturaleza de los plásmidos puede ser de utilidad a la hora de explicar la difusión de determinadas BLEE. Así, la diseminación de microorganismos productores de CTX-M-15, CTX-M-3, CTX-M-9 y CTX-M-14, entre otras BLEE, se ha asociado con plásmidos altamente transmisibles. La diseminación internacional de CTX-M-15 se debe a un plásmido del grupo IncFII, distribuido en países como Canadá, India, Kuwait, España y Portugal (Coque y cols., 2008b). En otros casos, se trata de fenómenos locales como ocurre con CTX-M-3 en Polonia donde un plásmido del grupo IncL/M es el responsable de la diseminación de esta enzima en distintos hospitales del país (Gołebiewski y cols., 2007). La persistencia de CTX-M-9 en España desde 1996 hasta 2003 se debe a la diseminación de plásmidos del grupo IncHI2, IncP e IncI (Novais y cols., 2006) y en el caso de CTX-M-14 en nuestra institución desde 2001 hasta 2005 se debe a plásmidos del grupo IncK (Valverde y cols., 2009).

### 4.3 Secuencias de inserción, transposones e integrones

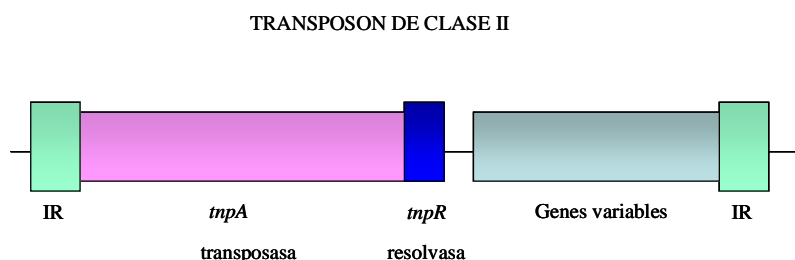
Los genes *bla*<sub>BLEE</sub> pueden estar asociados a secuencias de inserción de distinto tipo (*ISEcpI*, *ISCR1*, *IS26*) y transposones (*Tn3* y *Tn402*) que contribuyen a su movilización y/o expresión.

**Las secuencias de inserción** son elementos genéticos constituidos por secuencias cortas de DNA que codifican para una transposasa y están flanqueadas por secuencias repetidas e inversas (Figura 3). Estas estructuras están implicadas en la movilización de distintos genes *bla*<sub>BLEE</sub>. La familia de *ISEcpI* puede actuar en la movilización y como promotores en la expresión de genes *bla*<sub>CTX-M</sub> (Lartigue y cols., 2004; Poirel y cols., 2003). En el caso de *ISCR1*, se ha encontrado asociado a los genes *bla*<sub>CTX-M-9</sub> y *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (Arduino y cols., 2003; Novais y cols., 2006). Recientemente, se ha descrito la asociación de *IS26* con distintos genes *bla*<sub>CTX-M</sub> (Cullik y cols., 2010; Literacka y cols., 2009). En el caso de diferentes genes *bla*<sub>SHV</sub> (*bla*<sub>SHV-2</sub>, *bla*<sub>SHV-2a</sub>, *bla*<sub>SHV-5</sub> y *bla*<sub>SHV-12</sub>) se ha descrito la presencia de *IS26* en su entorno (Navarro y cols., 2007b).



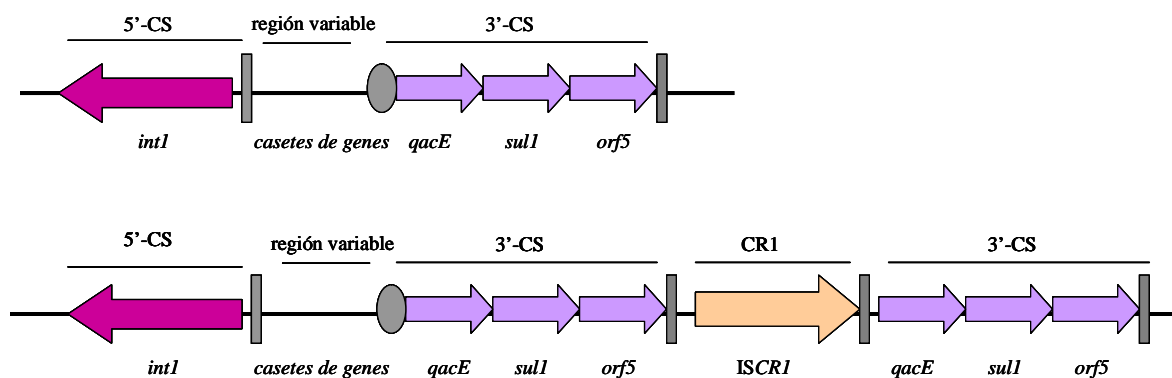
**Figura 3.** Representación esquemática de una secuencia de inserción. DR: secuencia repetida directa. IR: secuencia repetida e inversa

**Los transposones** son segmentos de ADN de mayor tamaño que las secuencias de inserción, capaces de insertarse en múltiples lugares del ADN diana. Contienen además del gen de la transposasa, responsable de su movilización, uno o varios genes entre los que se encuentran los de resistencia a antibióticos. Se han definido cuatro clases de transposones en enterobacterias según sus características estructurales y su mecanismo de transposición: a) transposones compuestos o transposones de clase I, b) transposones de clase II, c) transposones de la familia Tn5090-Tn7 y d) transposones conjugativos. Los transposones de clase II son los más prevalentes en enterobacterias y están compuestos por una transposasa, una resolvasa, un fragmento de ADN de tamaño variable, todo ello flanqueado por dos IR (secuencias repetidas e inversas) (Figura 4). Dentro de estos transposones se encuentran los derivados de Tn3 cuya transposasa y resolvasa se transcriben en dirección opuesta y de Tn21 en los que la transposasa y la resolvasa se transcriben en la misma dirección. Los derivados de Tn3 están asociados a la captura, expresión y diseminación de las enzimas tipo TEM e incluyen Tn1 (TEM-2), Tn2 (TEM-1), Tn801 (TEM-2) (Heffron y cols., 1975; Novais y cols., 2010; Partridge y cols., 2005a).



**Figura 4.** Representación esquemática de un transposón de clase II.

Los transposones defectivos de Tn402, también conocidos como **integrones** de clase 1 están asociados a BLEE de las clases A, B, C y D de Ambler. La estructura de los integrones de clase 1 consiste en la región conservada 5' (5'CS1), dónde se encuentra la integrasa, y la región conservada 3' (3'CS1), que incluye genes de resistencia a amonio cuaternario (*qacEAI*) y a sulfonamidas (*sulI*) (Figura 5). Algunos integrones de clase 1 denominados inusuales se caracterizan por tener una segunda copia de la región 3'CS (3'CS2) y una región que incluye *ISCR1*. Entre las regiones 5'CS1 y 3'CS1 se sitúan los casetes de genes, que forman la parte variable. Estos casetes de genes son elementos móviles que consisten en un gen que carece de promotor, normalmente de resistencia a antibióticos o desinfectantes y un sitio de recombinación *attC* o elemento de 59 pb. (Fluit y cols., 2004; Figura 5). Los genes *bla*<sub>BLEE</sub> pueden ser los casetes de genes de la parte variable como ocurre con *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>VEB</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> o *bla*<sub>VIM-2</sub> (Galani y cols., 2006; Laraki y cols., 1999; Naas y cols., 2006; Poiriel y cols., 2002; Tato y cols., 2010) o estar asociados corriente abajo de *ISCR1* como en el caso de *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>PER-3</sub> o *bla*<sub>VEB-3</sub> (Arduino y cols., 2002; Novais y cols., 2006, Toleman y cols., 2006) en integrones inusuales. Los integrones derivados de Tn402 se encuentran asociados a transposones mercuriales, como Tn21 en el caso de enterobacterias (Novais y cols., 2006, Tato y cols., 2010, Valverde y cols., 2006).



**Figura 5.** Representación esquemática de integrones de clase 1 e integrones de clase 1 inusuales.

## 5. ASOCIACIÓN CON OTROS MECANISMOS DE RESISTENCIA

Los microorganismos productores de BLEE contienen frecuentemente genes de resistencia a distintas familias de antibióticos como fluoroquinolonas, aminoglucósidos, trimetoprim-sulfametoxazol y más recientemente a carbapenemas. Esto plantea un gran problema clínico debido a la escasez de alternativas terapéuticas (Paterson y cols., 2005). La resistencia a estos antibióticos puede deberse a mutaciones o reorganizaciones cromosómicas o por la presencia de estos genes de resistencia en plásmidos, bien en el mismo que contiene el gen *bla* o en otro diferente.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto el aumento de aislados productores de BLEE multiresistentes (EARSS, 2008; Hernández y cols., 2005; Morosini y cols., 2006). En otros trabajos también se resalta el hecho de que las cepas productoras de BLEE son más resistentes a otras familias de antimicrobianos que las no productoras (Baquero y cols., 2009; Schwaber y cols., 2005).

### 5.1 Resistencia a quinolonas

Se han descrito varios mecanismos de resistencia a quinolonas en enterobacterias (Cattoir y cols., 2009; Jacoby, 2005):

- a) modificación de la diana por mutaciones en los genes de la girasa (*gyrA* y *gyrB*) y de la topoisomerasa IV (*parC*).
- b) disminución de la permeabilidad por pérdida o modificación de las porinas
- c) protección de la diana (proteínas Qnr, de codificación plasmídica).
- d) acción enzimática de una variante de la acetiltransferasa modificante de aminoglucósidos AAC(6')-Ib-cr.
- e) sistemas de expulsión activa tanto de localización cromosómica como plasmídica.

Algunos estudios han demostrado que los aislados productores de CTX-M son más resistentes a fluoroquinolonas que los de TEM o SHV (Lavigne y cols., 2004).

En los últimos años ha habido un aumento de la resistencia a quinolonas en aislados productores de BLEE a genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB* o *qnrS*), *qepA* o a *aac(6')-Ib-cr* que confieren resistencia de bajo grado a estos antibióticos. Estos genes se localizan en plásmidos y se han descrito en distintas especies de enterobacterias (Martínez-Martínez, 2007; Nordmann y cols., 2005)



## 5.2 Resistencia a aminoglucósidos

El principal mecanismo de resistencia a aminoglucósidos es la producción de enzimas modificantes (acetiltransferasas, nucleotidiltransferasas y fosfotransferasas). Los genes que codifican estas enzimas suelen formar parte de integrones y transposones. También se han descrito alteraciones en la dianas a nivel ribosómico o por metilación del 16S ARN, mediados en este último caso por genes que codifican las metilasas de tipo Arm o Rmt (Doi y cols., 2007; Galimand y cols., 2003; Smith y cols., 2002).

En diversos estudios se ha descrito la tasa de resistencia a aminoglucósidos en enterobacterias productoras de BLEE. Muchos de estos trabajos determinan la presencia de integrones que contienen estos genes (Gruteke y cols., 2003; Jones y cols., 2005; Machado y cols., 2007). Otros estudios describen la asociación entre metilasas y BLEE, siendo especialmente notable el caso de *armA* y *rmtB* con CTX-M-3 (Bogaerts y cols., 2007; Cantón y cols., 2008b).

## 5.3 Resistencia a carbapenemas

Los mecanismos de resistencia a carbapenemas descritos en distintos microorganismos son:

- a) hiperexpresión de bombas de expulsión debido a mutaciones en los genes correspondientes de *P. aeruginosa* (Juan Nicolau y cols., 2010).
- b) pérdida de porinas asociada a la hiperproducción de AmpC cromosómica en *P. aeruginosa* o a la producción de BLEE en enterobacterias (Martínez-Martínez, 2008).
- c) producción de carbapenemasas (Queenan y cols., 2007; Tabla 2).
  - i) beta-lactamasas de clase A:
    - 1. cromosómicas (IMI, NMC-1, SME) descritas en *E. cloacae* y *S. marcescens*.
    - 2. plasmídicas (KPC y GES) en enterobacterias y *P. aeruginosa*.
  - ii) beta-lactamasas de clase B (metalo-beta-lactamasas; VIM e IMP) en enterobacterias y *P. aeruginosa*.
  - iii) beta-lactamasas de clase D (OXA) en *A. baumannii*.

Las carbapenemas constituyen uno de los antibióticos de elección en el tratamiento de infecciones graves producidas por microorganismos productores de BLEE. En los últimos

años ha aumentado el número de aislados productores de BLEE que también son resistentes a carbapenemas bien por la producción de metalo-beta-lactamasas tipo VIM causantes de brotes en distintos hospitales (Biendo y cols., 2008; Cagnacci y cols., 2008b; Kassis-Chikhani y cols., 2006; Tato y cols., 2007) o por la presencia de enzimas tipo KPC, principalmente en *K. pneumoniae* y asociadas al clon ST258 (Kassis-Chikhani y cols., 2010; Kontopoulou y cols., 2010; Tóth y cols., 2010) o a los clones ST388 y ST384 (Curiao y cols., 2010).

#### 5.4 Resistencia a otros antimicrobianos

Los elementos genéticos que contienen los genes *bla* también pueden incluir genes de resistencia a otros antimicrobianos como trimetoprim, sulfonamidas o tetraciclinas. Estos elementos incluyen integrones de clase 1, 2 y 3, en el caso de trimetoprim y sulfonamidas (Machado y cols., 2007; Novais y cols., 2006) y transposones para las tetraciclinas (Boyd y cols., 2004).

### 6. BLEE EN ESPAÑA

Desde que se detectaron por primera vez, se han realizado diferentes estudios de prevalencia de microorganismos productores de BLEE en España, tanto a nivel local como a nivel nacional. Un primer estudio de Sabaté y cols. en el área de Barcelona con aislados obtenidos entre 1994 y 1996, muestra una prevalencia muy baja tanto de *K. pneumoniae* como de *E. coli*, a pesar de ello es remarcable la diversidad de enzimas que describen (CTX-M-9, TEM-12, SHV-12) (Sabaté y cols., 2002a).

En otro trabajo realizado posteriormente en Sevilla por Romero y cols. donde analizan los aislados obtenidos desde 1995 a 2003 en el Hospital Virgen Macarena, se muestran claras diferencias entre la epidemiología de *K. pneumoniae* y *E. coli*, siendo más prevalente la primera. La mayoría de aislados de *K. pneumoniae* son de origen hospitalario, mientras que los de *E. coli* pertenecen al compartimento extahospitalario. Los aislados de *E. coli* presentaron una mayor diversidad clonal. Los tipos de BLEE más prevalentes son CTX-M-14 y SHV-12, aunque también se detectan otras variantes, dando lugar a una alta diversidad de enzimas (Romero y cols., 2005).

Briñas y cols. estudian los aislados de *E. coli* productor de BLEE recogidos durante los años 2002-2003 en el Hospital Universitario Central de Asturias. La prevalencia de los mismos fue baja y las enzimas predominantes fueron las del grupo CTX-M-9, aunque

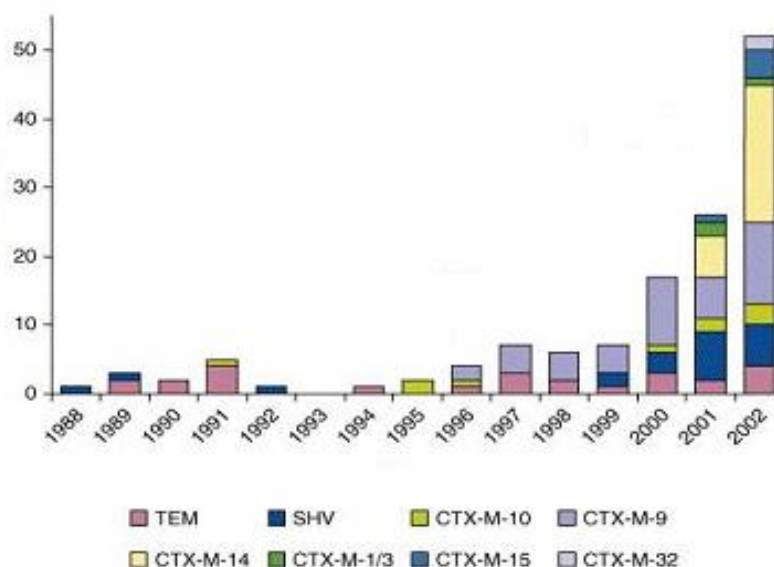
también se detectan otros tipos como CTX-M-32, SHV-12 o TEM-52<sub>C</sub> (Briñas y cols., 2005a).

En un trabajo reciente de Blanco y cols. caracterizan las BLEE producidas por aislados de *E. coli* obtenidos desde 2006 a 2008 en el Hospital Xeral-Calde de Lugo. Estos autores muestran un aumento de la prevalencia de este microorganismo y la presencia de CTX-M-14 y CTX-M-15 como enzimas más frecuentes (Blanco y cols., 2009).

En los tres estudios multicéntricos realizados entre diversos hospitales de España, con aislados recogidos en 2000, 2004 y 2009 (Ángel Díaz y cols., 2009; Diestra y cols., 2008; Hernández y cols., 2005) todos muestran una tendencia común, con un aumento en la prevalencia de *E. coli* productor BLEE frente a *K. pneumoniae*, una mayor diversidad clonal en aislados de *E. coli* y también diferente origen, siendo *E. coli* predominantemente comunitario. En cuanto a los tipos de BLEE, se muestra un cambio epidemiológico, así en el estudio de 2000 (Hernández y cols., 2005), CTX-M-9 fue la más prevalente, seguida de SHV-12 y de CTX-M-14. En 2004, la enzima más frecuente fue CTX-M-14 y también se describieron enzimas del grupo CTX-M-1 (Diestra y cols., 2008).

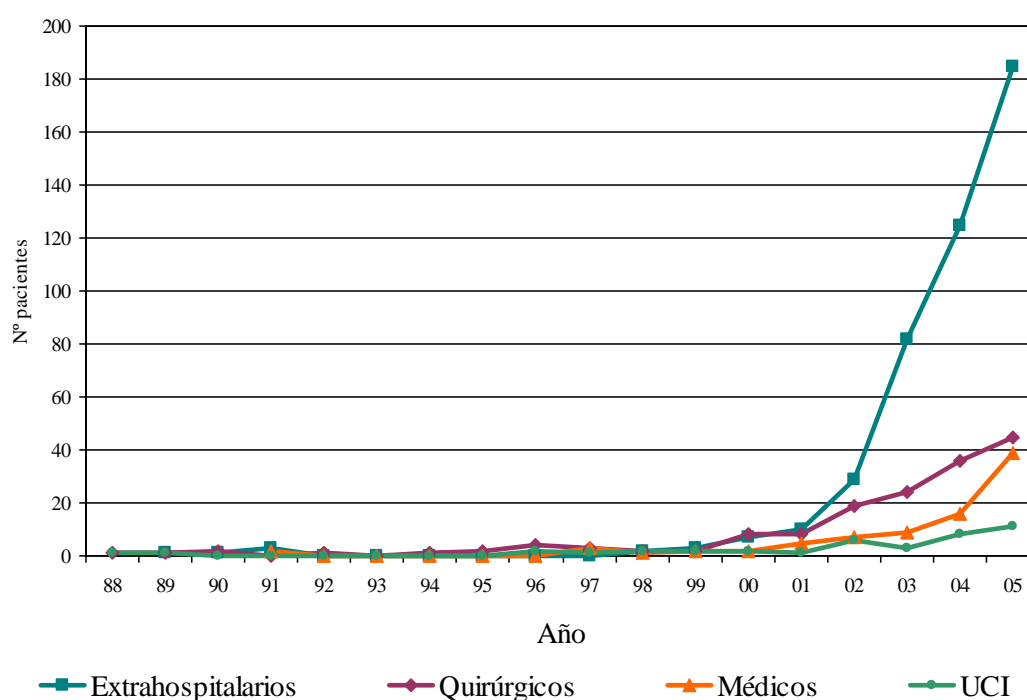
## 7. BLEE EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL

El Hospital Universitario Ramón y Cajal es un centro sanitario de 1500 camas situado en la zona norte de Madrid y que atiende a una población de 550.000 habitantes. Desde su primera descripción en 1988 en este Hospital y hasta la actualidad, las BLEE han experimentado un crecimiento exponencial tanto en número como en diversidad genética (Baquero y cols., 1988; Cantón y cols., 2006). La primera enzima detectada fue SHV-2 en 1988, seguida de TEM-4 en 1989 y CTX-M-10 en 1991 (Coque y cols., 2002, Fernández-Rodríguez y cols., 1992; Oliver y cols., 2001). A partir de 1996, el aumento de las BLEE de tipo CTX-M fue muy notable, apareciendo variantes de las distintas familias de manera escalonada. Así las enzimas del grupo CTX-M-9 aparecieron a finales de los 90 (CTX-M-9 en 1996 y CTX-M-14 en 2000) y de forma simultánea a partir del 2000 se describieron las del grupo CTX-M-1 (CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-15 y CTX-M-32) (Novais y cols., 2006; Novais y cols., 2007; Valverde y cols., 2009) (Figura 6). Algunas de estas enzimas, como TEM-4, SHV-12, CTX-M-14, o CTX-M-10, son especialmente prevalentes y en la actualidad se siguen detectando en asociación a clones o elementos epidémicos.



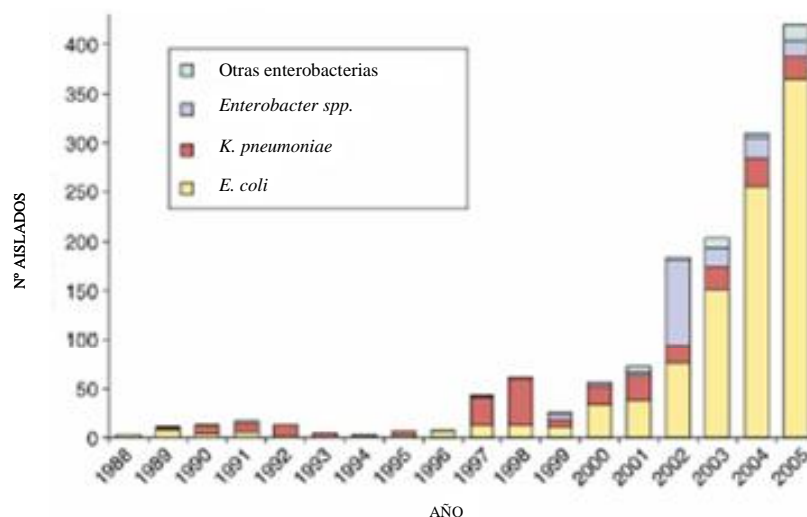
**Figura 6.** Epidemiología de *E. coli* productor de BLEE en el Hospital Universitario Ramón y Cajal (1988-2002). Adaptado de Cantón y cols., 2006.

En los últimos años también se ha experimentado un notable aumento del número de pacientes colonizados/infectados, sobre todo en el ámbito hospitalario. Así en 2005, un total de 320 pacientes (65% de la comunidad) padecía infecciones por microorganismos productores de BLEE, principalmente infecciones del tracto urinario, y donde *E. coli* fue la especie más comúnmente detectada. (Cantón y cols., 2006) (Figura 7).



**Figura 7.** Distribución de pacientes con *E. coli* productor de BLEE en diferentes áreas de hospitalización y en el medio extrahospitalario del Hospital Universitario Ramón y Cajal (1988-2005).

Las especies donde más se aíslan estas enzimas son *E. coli* y *K. pneumoniae*, seguidas de *Enterobacter* spp. Otras enterobacterias con escasa representación son *K. oxytoca*, *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., y *M. morganii* (Cantón y cols., 2006; Figura 8).



**Figura 8.** Microorganismos productores de BLEE del Hospital Universitario Ramón y Cajal (1988-2005). Adaptado de Cantón y cols., 2006.

En general, la estructura poblacional de estos aislados se caracteriza por una gran diversidad dentro de cada especie, aunque se han aislado clones epidémicos detectados a lo largo del tiempo, por ejemplo el de *Salmonella enterica* productor de TEM-27 en 1989, *K. pneumoniae* productor de TEM-4 desde 1997 a 2005, *E. coli* productor de TEM-4 desde 1989 a 1997, *E. aerogenes* productor de TEM-24 desde 1998 hasta 2004, *E. coli*-ST131 productor de CTX-M-15 (2001-05) y *E. coli* productor de CTX-M-1 en los años 2001 y 2002. (Cantón y cols., 2002; Coque y cols., 2002; Morosini y cols., 1996; Novais y cols., 2007; Valverde y cols., 2008a).

## **OBJETIVOS**



Esta tesis doctoral tiene como misión profundizar en el conocimiento de las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), de los elementos genéticos que contienen los genes correspondientes y de los microorganismos que las producen con un abordaje epidemiológico y de aplicación de diferentes técnicas de microbiología molecular. Esta aproximación es esencial para comprender la importancia epidemiológica y algunos de los factores que han contribuido a la diseminación de este mecanismo de resistencia. Su estudio a partir de colecciones de microorganismos obtenidos de muestras clínicas de pacientes, de estudios ecológicos de colonización (portadores) tanto en el hospital como en la comunidad y de muestras de aguas y alimentos responde a la necesidad de analizar este problema y generar conocimiento científico para ofrecer respuestas y establecer estrategias ante el problema de salud pública que constituyen los microorganismos productores de BLEE.

Nuestra hipótesis de trabajo se fundamentó en establecer la importancia del compartimento intestinal de los pacientes hospitalizados e individuos de la comunidad como reservorio de microorganismos productores de BLEE y como indicador de la epidemiología y los tipos de enzimas encontrados en la clínica. Los aislados clínicos de *K. pneumoniae* podrían también utilizarse para el análisis espacio-temporal de las BLEE a pesar del aumento espectacular de *E. coli* productor de estas enzimas observado en los últimos años. En el aumento de los aislados productores de BLEE habrían contribuido no sólo determinados clones sino también los diferentes elementos genéticos asociados a los distintos tipos de enzimas.

Objetivo general: Analizar la epidemiología, la estructura poblacional y profundizar en el estudio de los elementos genéticos implicados en la diseminación de enterobacterias productoras de BLEE en el ámbito hospitalario (Hospital Universitario Ramón y Cajal) y en el extrahospitalario (Área sanitaria 4 de la Comunidad de Madrid).



Objetivos específicos:

- Estudiar la **prevalencia** de **portadores fecales** de aislados de enterobacterias productoras de BLEE en pacientes hospitalizados y en sujetos de la comunidad.
- Determinar la **epidemiología** de estos aislados (de **portadores fecales**), su estructura poblacional, describir las enzimas que producen y los perfiles de sensibilidad a antibióticos no beta-lactámicos.
- Describir la **prevalencia** y **epidemiología** de los microorganismos productores de BLEE procedentes de muestras de **aguas** y **alimentos**, su estructura poblacional, las enzimas que producen y los perfiles de sensibilidad a antibióticos no beta-lactámicos.
- Analizar la **epidemiología** de aislados clínicos de *K. pneumoniae* productor de BLEE y caracterizar su estructura poblacional, las enzimas producidas, los plásmidos implicados en su diseminación y los perfiles de sensibilidad a distintos antimicrobianos.
- Describir la epidemiología molecular de las BLEE más frecuentemente aisladas en la comunidad; **CTX-M-2**, **CTX-M-14** y **SHV-12**; y de los **elementos genéticos** en los que están contenidas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## **1. MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO DE ENTEROBACTERIAS CON BLEE**

Los microorganismos productores de BLEE analizados en esta tesis se aislaron a partir de heces de pacientes hospitalizados, de heces de sujetos de la comunidad, de muestras clínicas y de muestras de aguas y alimentos.

### **1.1 Muestras de heces de pacientes portadores**

Los estudios de portadores fecales se realizaron en tres etapas: 1991, 2003 y 2007. En el año 2003 (enero-junio) se analizó la presencia de enterobacterias productoras de BLEE en un total de 400 muestras fecales de 386 pacientes (76,0% ambulatorios). En el año 2007 (febrero-abril) se volvió a repetir el estudio con un total de 500 muestras de 462 pacientes (68,4% ambulatorios). A efectos de comparación, se incluyeron los datos obtenidos en la tesis doctoral del Dr. D: Rafael Cantón (Cantón, Tesis Doctoral, 1994) donde se analizaron 1.239 muestras fecales de 849 pacientes (64,1% ambulatorios) recogidos durante el periodo abril-diciembre del año 1991.

Todas las muestras fueron procesadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal, y la recogida se realizó siempre en una situación de aparente ausencia de brote epidémico.

### **1.2 Muestras de heces de voluntarios sanos portadores**

Se incluyeron 108 muestras de voluntarios sanos (sin hospitalización y/o tratamiento antibiótico en los tres meses previos a la toma de muestras) recogidas en durante el periodo enero-junio del año 2003.

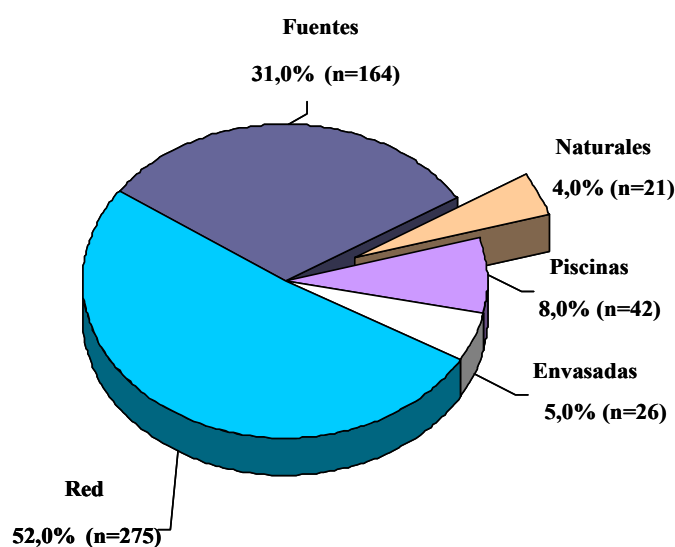
### **1.3 Muestras de heces de convivientes de pacientes con infección por enterobacterias con BLEE**

Doscientos noventa y nueve pacientes (56,0% de ellos ambulatorios) que presentaban infecciones por microorganismos productores de BLEE adquiridas en la comunidad (casos índice) fueron seleccionados prospectivamente a partir del sistema informático de gestión del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal durante un período de quince meses (abril de 2004 a junio de 2005).

Se obtuvieron muestras clínicas y de heces de 40 casos índice (37 infecciones del tracto urinario, 2 bacteriemias y 1 infección de tejido blando) y muestras de heces de 54 personas que convivían junto a 29 de los casos índices.

#### 1.4 Muestras ambientales de aguas y alimentos

Se analizaron 528 muestras de aguas de diferentes orígenes obtenidas en la Comunidad de Madrid entre los años 2003 y 2004, y remitidas para control sanitario al Laboratorio Municipal de Salud Pública del Ayuntamiento de Madrid (Figura 9).



**Figura 9.** Muestras de aguas analizadas para la detección de *enterobacterias* productoras de BLEE.

Se incluyeron en el estudio 203 muestras de alimentos: 21 de ellas de alimentos no cocinados y 182 alimentos cocinados, recogidas en el año 2004 remitidas para control al Laboratorio Municipal de Salud Pública del Ayuntamiento de Madrid.

### **1.5 Aislados clínicos productores de BLEE**

Se incluyeron distintos aislados clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE procedentes del cepario del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal para estudios de estructura poblacional [grupos filogenéticos, electroforesis en geles de campo pulsado (PFGE) y multilocus sequence typing (MLST)] y caracterización de elementos genéticos de transferencia horizontal (plásmidos, transposones y secuencias de inserción) y su comparación con los aislados procedentes de la comunidad. El origen de los aislados clínicos se detalla a continuación.

#### **1.5.1 *Escherichia coli***

Se estudiaron aislados clínicos de *E. coli* productores de CTX-M-14 (n=26) y SHV-12 (n=14) obtenidos durante los años 2000 a 2002.

#### **1.5.2 *Klebsiella pneumoniae***

Se analizó una colección de 180 aislados clínicos de *K. pneumoniae* con un fenotipo compatible con la producción de BLEE. Estos aislados se obtuvieron de muestras clínicas y de vigilancia epidemiológica de 125 pacientes (26,4% ambulatorios) durante el periodo 2001-2006. Para los distintos estudios, se seleccionó un aislado por paciente. Con propósitos meramente comparativos, se incluyó otra colección de 62 aislados de *K. pneumoniae* productores de BLEE recogidos en el mismo Laboratorio desde la primera aparición de estas enzimas en esta especie en 1989 y hasta 2000 (Coque y cols., 2002).

## 2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

**Muestras de heces.** Un total de 0,5 g de cada muestra de heces se homogeneizaron en 5 ml de salino. Se plaqueó una alícuota de 200 µl en placas de agar de MacConkey (Oxoid Ltd, Basingstoke, RU) suplementadas con 1 µg/ml de cefotaxima y 1 µg/ml de ceftazidima y se incubaron durante 24/48 h a 37°C. Para las muestras fecales obtenidas en 2007, además del procedimiento anteriormente descrito, se utilizó en paralelo el medio cromogénico ChromidID<sup>TM</sup> ESBL (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Este medio está constituido por una base nutritiva rica de diferentes peptonas, contiene inhibidores del crecimiento de levaduras, una mezcla de antibióticos, entre ellos la cefpodoxima que permite el crecimiento selectivo de enterobacterias productoras de BLEE y dos substratos cromogénicos y uno natural que permiten la identificación directa de las enterobacterias productoras de BLEE más frecuentemente aisladas. Los aislados de *E. coli* aparecen con coloración rosa a burdeos en las cepas productoras de β-glucuronidasa; *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, con coloración verde o azul en las cepas que expresan una β-glucosidasa y *Proteus*, *Providencia* y *Morganella*, con coloración parda a marrón en las cepas que expresan una desaminasa. La valoración de los resultados obtenidos en este medio se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante.

**Muestras de aguas.** Se filtraron 100 ml de cada muestra de agua previamente homogeneizada utilizando una membrana estéril de celulosa de 0,45 µm de poro y un sistema de vacío. Las membranas se colocaron sobre placas con medio de cultivo sólido agar-lactosa trifetil-tergitol 7 (Chapman TTC) que se incubaron a 37°C durante 24 h. Posteriormente, las membranas se resuspendieron en 5 ml de suero salino, y tras la homogeneización de las mismas, se inoculó una alícuota de 100 µl en placas de agar de MacConkey (Oxoid Ltd) suplementadas con 1 µg/ml de cefotaxima y ceftazidima que se incubaron a 37°C durante 24 h.

**Muestras de alimentos.** Una alícuota de 25 g se resuspendió en agua de peptona tamponada (dilución 1:10) y se homogeneizó utilizando un homogeneizador peristáltico durante 1-2 min. Del sobrenadante se hicieron las diluciones correspondientes ( $10^{-3}$ - $10^{-4}$ ) sembrándose una alícuota de 100 µl en placas de agar de MacConkey (Oxoid Ltd) suplementadas con 1 µg/ml de cefotaxima y 1 µg/ml de ceftazidima y se incubaron a 37°C durante 24 h.

### 3. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA Y SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

La identificación de las cepas y la sensibilidad a distintos antibióticos se realizó con el sistema semiautomático PASCO (Difco, Detroit, MI, EEUU) hasta finales del año 1999 y con el sistema semiautomático WIDER (Fco. Soria Melguizo, Madrid, España) a partir de enero de 2000. Ambos sistemas utilizan paneles con sustratos para la identificación bioquímica de los microorganismos y con concentraciones de antimicrobianos en base 2 para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). El inóculo utilizado ( $5 \times 10^4$  UFC/ml) es el recomendado por el CLSI, realizándose la lectura de los paneles a las 18 h tras incubación a 35°C.

La confirmación de los patrones de sensibilidad se llevó a cabo de acuerdo al método de microdilución en caldo siguiendo las directrices del CLSI (CLSI, 2010).

El perfil de resistencias a antibióticos no beta-lactámicos asociadas a la producción de BLEE se determinó por el método de difusión en disco e incluyó los siguientes antimicrobianos: ácido nalidíxico (30 µg), amicacina (30 µg), apramicina (15 µg), ciprofloxacino (5 µg), cloranfenicol (30 µg), espectinomicina (100 µg), estreptomina (10 µg), gentamicina (10 µg), kanamicina (30 µg), neomicina (30 µg), netilmicina (30 µg), sulfonamida (300 µg), tetraciclina (30 µg), tobramicina (10 µg) y trimetoprim (5 µg). Todos los discos fueron proporcionados por Oxoid (Oxoid Ltd). Se preparó un inóculo de  $10^4$  UFC/ml, con una turbidez similar al 0,5 de la escala de McFarland, en 5 ml de suero salino y se plaqueó en placas comerciales de Mueller-Hinton (bioMérieux) siguiendo el esquema de trabajo del CLSI (CLSI, 2010). La lectura de los halos de inhibición se realizó a las 18-20 h tras incubación a 37°C y se interpretaron igualmente según los criterios del CLSI (CLSI, 2010).



## 4. TÉCNICAS MOLECULARES

La caracterización y localización de las distintas BLEE, determinación de estructura poblacional y caracterización de los elementos genéticos dónde se encuentran se llevaron a cabo con las técnicas moleculares descritas a continuación.

### 4.1 Extracción de ADN

#### 4.1.1 ADN genómico

La extracción de ADN genómico procedente de cepas salvajes se realizó por los métodos de hervido, por un método comercial o por el método de extracción *in situ*. El ADN obtenido se utilizó para la amplificación de los distintos genes *bla*<sub>BLEE</sub> y los estudios de clonalidad (ver 4.3, 5 y 6).

**En el método del hervido**, basado en la extracción por calor, se resuspendió un inóculo bacteriano de cultivo en placa de agar Luria-Bertani (LB, Pronadisa, Madrid, España) de 24 h en 300 µl de agua estéril, y se hirvió durante 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min y se recogió el sobrenadante que se utilizó para las distintas reacciones.

**El método comercial** utilizado fue Dneasy Blood and Tissue kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Se resuspendió un inóculo bacteriano de cultivo en placa de LB de 24 h en una solución de lisis y tratamiento de la muestra con proteinasa K (20 mg/ml). Se centrifugó el lisado bacteriano y el sobrenadante se purificó mediante columnas de sílice donde el ADN se adsorbe específicamente. Finalmente, se lavó la columna para eliminar posibles contaminantes y se eluyó el ADN con agua estéril.

**La extracción de ADN *in situ***, en la que el ADN se embebe en agarosa, se realizó mediante el siguiente protocolo: a partir de una colonia de cultivo en placa de LB de 24 h, se realizó un cultivo de 18-20 h en 2 ml de caldo Luria-Bertani (LB, Pronadisa). Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min y las células se resuspendieron en 200 µl de tampón cloruro Sódico-EDTA (SE; 75 mM NaCl, 25 mM EDTA pH=8,0). Se mezcló con 200 µl de agarosa D5 (Pronadisa, Madrid, España) fundida en tampón Tris-Borato-EDTA TBE 0,5x (44,5 mM Tris base, 44,5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA pH=8,0) para obtener bloques de agarosa. Tras la solidificación de los bloques, se procedió a la lisis y desproteinización celular con una solución de Sarcosil 1%, proteinasa K 50 µg/ml y completar volumen con EDTA 0,5 M pH=9,6, con una incubación de 24 h a 54°C en agitación. Posteriormente, se realizaron 3

lavados, uno a 54°C y los dos restantes a T<sup>a</sup> ambiente con tampón TrisHCl-EDTA (TE; 10 mM Tris HCl pH=8,0; 0,1 mM EDTA pH=8,0) durante 15 min cada uno. Una vez finalizados los lavados, los bloques de agarosa se conservaron en tampón TE a 4°C.

#### 4.1.2 ADN plasmídico

La obtención de plásmidos se realizó con el método lisis alcalina de Birnboim y Doly (Birnboim y cols., 1979), el método Kado y Liu (Threlfall y cols., 1995) y el método de Barton (Barton y cols., 1995).

El método de la **lisis alcalina de Birnboim y Doly** se basa en la diferente resistencia a valores de pH básicos del ADN plasmídico y cromosómico (Birnboim y cols., 1979). La lisis celular y desnaturalización del ADN plasmídico y cromosómico se produce por una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS 1%) y NaOH (0,2 N). La neutralización con acetato potásico (3 M, pH=5,0) permite que el ADN plasmídico vuelva a su configuración covalente circular cerrada y por tanto permanezca soluble mientras el ADN cromosómico y las proteínas precipitan en un complejo formado por potasio y SDS que se elimina por centrifugación. El ADN plasmídico en el sobrenadante se purifica con una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (1:1:24) y una solución de cloroformo. El ADN plasmídico se recupera por precipitación con una solución de etanol-acetato potásico (1:10) y finalmente se concentra por precipitación con etanol. Este método se utiliza para la extracción de plásmidos de alto o medio número de copias y tamaños menores de 50 Kb. Existen versiones comerciales basadas en este método que utilizan resinas de intercambio iónico como método de purificación. En esta tesis se utilizaron el método comercial QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen). Partiendo de un pre-inóculo de cultivo bacteriano en 5 ml de caldo LB suplementado con el antibiótico correspondiente (cefotaxima o ceftazidima en una concentración de 2 µg/ml) que se incubó durante 6 h a 37°C en agitación. Posteriormente, se realizó un inóculo 1:5 del cultivo anterior en caldo LB también suplementado con el antibiótico correspondiente en las mismas concentraciones anteriores, durante 18 h a 37°C. A partir de este cultivo, se continuó con la extracción siguiendo las indicaciones del fabricante. Este método permite la obtención de plásmidos de bajo número de copias y alto peso molecular (hasta 150 Kb).

**El método Kado y Liu** permite la rápida extracción de plásmidos en su conformación covalente circular cerrada con un amplio rango de peso molecular y combina el tratamiento a elevado pH con una elevada T<sup>a</sup> (55°C) con lo que se intenta reducir la obtención de ADN

cromosómico en la preparación final (Threlfall y cols., 1995). Las proteínas residuales obtenidas en el proceso son eliminadas por extracción con fenol:cloroformo. El protocolo fue el siguiente: partiendo de un cultivo en placa de LB de 24 h, se resuspendió un inóculo bacteriano en tampón TE. Se añadió a continuación la solución de lisis (3% SDS, 50 mM Tris, y 125 mM NaOH 2 N) incubándose a 55-60°C durante 3-4 h. Posteriormente, se añadió fenol-cloroformo y agitó hasta obtener una emulsión, que se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min y se separó la fase superior. Los plásmidos se separaron en un gel de agarosa mediante electroforesis en corriente continua (ver 4.4.1).

**El método de Barton** consiste en el análisis mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE) de ADN genómico digerido con S1 nucleasa (ver 4.2; Barton y cols., 1995). Esta enzima digiere totalmente el ADN cromosómico y lineariza el ADN plasmídico superenrollado, lo que permite su separación mediante PFGE, donde la migración en estos geles es proporcional a su tamaño y comparable a los marcadores de peso molecular utilizados. La extracción del ADN se realizó por el método de extracción *in situ* (ver 4.1.1).

#### 4.2 Digestión de ADN

**La digestión de ADN plasmídico** y de productos de PCR purificados se realizó con distintas enzimas de restricción y condiciones dependiendo de los objetivos de cada estudio (ver 9.1.3).

**La digestión de ADN extraído *in situ*** se llevó a cabo con las correspondientes enzimas de restricción según el estudio (ver 6.2, 8 y 9.1.2) con el siguiente protocolo general: se cortaron porciones de cada uno de los bloques (aproximadamente 1/3) y se incubaron con 100 µl de la mezcla de digestión (1x del tampón de la enzima y 6-30 U de la enzima) a 37°C durante tiempos variables según cada protocolo específico (15 min-24 h) (ver 4.4.2)

#### 4.3 Amplificación de ADN

La técnica de amplificación de ADN por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se utilizó en los siguientes estudios: caracterización genotípica de genes *bla*<sub>BLEE</sub>, genes de mantenimiento celular (MLST) y elementos genéticos de transferencia horizontal (plásmidos y secuencias de inserción). Todas las reacciones se llevaron a cabo en termocicladores MJ Research PTC-100 (Global Medical Instrumentation Inc., MINN, EEUU). Las cantidades de reacción y las condiciones dependieron del tamaño de los fragmentos a amplificar.

#### 4.3.1 Fragmentos de ADN menores de 3Kb

Las reacciones se prepararon en un volumen final de 20  $\mu$ l con los siguientes componentes a la concentración final indicada entre paréntesis: tampón de reacción (1x),  $MgCl_2$  (1,5 mM), mezcla dNTPs (0,2 mM), cebadores directo y reverso (1  $\mu$ M de cada uno), polimerasa (0,5-1,5 U), ADN molde (1  $\mu$ l). Las polimerasas utilizadas fueron: i) TaKaRa Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japón) (0,5 U); enzima de baja fidelidad que puede utilizarse en reacciones de PCR que no necesiten requerimientos muy específicos; ii) AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Norwalk, CONN, EEUU) (1,5 U); polimerasa de alta fidelidad y especificidad que debido a su activación a altas temperaturas, disminuye la posibilidad de formación de productos inespecíficos aumentando el rendimiento. Las condiciones de amplificación específicas se muestran en las tablas 4-11.

#### 4.3.2 Fragmentos de ADN mayores de 3Kb

Las reacciones se prepararon generalmente en un volumen final de 25  $\mu$ l con los siguientes componentes a la concentración final indicada entre paréntesis: tampón de reacción (1x),  $MgCl_2$  (2,5 mM), mezcla dNTPs (2,5 mM) cebadores directo y reverso (0,1  $\mu$ M de cada uno), polimerasa TaKaRa LA Taq (TaKaRa Bio Inc.) (2,5 U), ADN molde (1  $\mu$ l). La polimerasa TaKaRa LA Taq es una polimerasa de alta fidelidad y eficiencia que permite amplificar fragmentos de ADN de hasta 15 Kb. Las condiciones de amplificación se especifican en las tablas 10 y 11.

### 4.4 Separación de ADN

La separación de ADN se realizó por electroforesis en geles de agarosa de corriente continua o de corriente alterna.

#### 4.4.1 Electroforesis en corriente continua

En esta electroforesis se aplica un campo eléctrico de corriente continua que permite separar fragmentos de ADN comprendidos entre 10 pb y 50 Kb. La resolución de esta técnica para fragmentos mayores de 20 Kb es baja. Esta técnica se ha utilizado en esta tesis para la separación de fragmentos productos de PCR amplificados y la separación de plásmidos digeridos o sin digerir. Los pasos a seguir para realizar la técnica son:

a) Preparación de geles de agarosa. La agarosa utilizada fue D-1 Low EEO (Pronadisa) que por su baja electrendósmosis (0,05-0,13%) permite una gran movilidad. Los geles se prepararon en tampón TBE 0,5x a distintas concentraciones dependiendo del tamaño del fragmento a separar (0,8%-2,0% peso/volumen). Los fragmentos de tamaños comprendidos entre 1 Kb y 10 Kb se utilizaron geles de agarosa del 0,8% y para los de tamaños entre 100 pb y 1 Kb geles del 2,0%.

b) Electroforesis. Los pocillos de los geles se cargaron con volúmenes variables de ADN (2-4  $\mu$ l en el caso de productos de PCR y 15-30  $\mu$ l para los plásmidos) mezclado con un volumen de tampón de carga de 2 a 5  $\mu$ l. La separación de los distintos fragmentos se realizó en una cubeta horizontal, con tampón TBE 0,5x a 100 V durante un tiempo variable de 30 min para los productos de PCR y 4 h para la separación de ADN plasmídico. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron  $\lambda$ -EcoT14 I/Bgl II digest (60-2392 pb) y 100 bp DNA ladder (100-1500 pb) (TaKaRa Bio Inc.).

#### 4.4.2 Electroforesis en corriente alterna o electroforesis de campo pulsado (PFGE)

Esta electroforesis utiliza un gradiente de corriente alterna que permite la resolución de moléculas de alto peso molecular (desde 20 Kb a 10 Mb). Los distintos pulsos eléctricos que se producen permiten la reorientación y migración de los fragmentos según su peso molecular.

Los pasos previos a la separación son: la extracción de DNA *in situ* en bloques de agarosa (4.1), la digestión con distintas enzimas de restricción dependiendo del tipo de estudio (4.2), y la preparación del gel.

a) Preparación de geles de agarosa. Para la separación de los fragmentos de ADN, se cargaron los moldes de agarosa, previamente digeridos, en un gel de agarosa D5 (Pronadisa) al 1,2% en TBE 0,5x. Las características de la agarosa utilizada permiten una separación óptima de fragmentos de ADN por PFGE, puesto que su bajo valor de electroendósmosis (<0,120) permite una mayor movilidad electroforética.

b) Electroforesis de campo pulsado (PFGE). La separación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo en el sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad, La Jolla, CA., EEUU), aplicando las siguientes condiciones: 14°C, 6 V/cm<sup>2</sup> y condiciones de electroforesis distintas dependiendo del estudio: para la digestión con *Xba*I (TaKaRa Bio Inc.) (10-40 s, durante 24 h), digestión

con I-CeuI (New England Biolabs, Inc, Ipswich, MA, EEUU) (5-25 s durante 23 h seguido de una rampa de 60-120 s durante 10 h) y digestión con S1 nucleasa (TaKaRa Bio Inc.) (5-25 s durante 3 h y una segunda rampa de 30-45 s durante 12 h). Los marcadores de peso molecular utilizados fueron: Lambda Ladder PFG Marker (48,5-1000,18 Kb) y Low Range PFG Marker (0,13-194 Kb) (New England Biolabs, Inc.).

#### 4.4.3 Tinción y visualización

La visualización de los fragmentos separados por electroforesis se realizó por tinción de los geles con bromuro de etidio a una concentración final de 0,2 µg/ml. El bromuro de etidio es un agente que se intercala en el ADN y que permite visualizar las moléculas de ácido nucleico mediante luz ultravioleta.

Los geles de agarosa destinados a la separación de productos de PCR se preparan con bromuro de etidio, al contrario de los destinados a la separación de plásmidos o de fragmentos de ADN por PFGE que se tiñen después de la electroforesis (10-15 min) para evitar que las moléculas intercaladas con el bromuro de etidio se degraden por efecto de la luz ultravioleta.

Todos los geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaron con el equipo Gel Logic 100 Imaging System (Carestream Health, Inc., Rochester, NY, EEUU).

#### 4.5 Purificación y secuenciación de ADN

Los productos de PCR obtenidos se purificaron con QIAquick PCR purification kit (Qiagen GmbH) o con ExoSAP-IT® purification kit (USB Corp., Cleveland, OH, EEUU) en el caso de los productos de amplificación obtenidos en los estudios de clonalidad por MLST y fueron secuenciados con el secuenciador automático ABI Prism 377 (PE, Norwalk, CONN, EEUU).

#### 4.6 Análisis bioinformático

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó mediante el programa Chromas (versión 2.32, Technelysium Pty. Ltd, Tewantin, Australia), la comparación y los alineamientos entre distintas secuencias mediante los programas BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) y ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)), respectivamente. La determinación de las distintas variantes de BLEE se realizó utilizando los datos disponibles en la página [www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies).

El tamaño molecular de los plásmidos se determinó utilizando el programa informático Kodak 1D 3.6.

La comparación y determinación de los complejos clonales se realizó mediante el algoritmo eBURST versión V3 disponible en <http://eburst.mlst.net> (Feil y cols., 2004).

Los árboles filogenéticos de las replicasas y relaxasas se realizaron mediante el método neighbour-joining, usando el modelo p-distance con delección completa, y comprobado por medio de los valores de bootstrap obtenidos a partir de 1000 réplicas, utilizando el programa MEGA versión 3.1 (Kumar y cols., 2004).

#### 4.7 Hibridación

La identificación de genes o secuencias en genomas o plásmidos se realizó por hibridación del ADN con sondas específicas obtenidas por PCR. Este proceso se realiza en los siguientes pasos: separación, transferencia y fijación del ADN a una membrana, marcaje de las sondas, la hibridación del ADN y el revelado.

La separación de los fragmentos de ADN se realizó por electroforesis en corriente continua o por PFGE (ver apartado 5.4). Después de la tinción y visualización del gel (5.4.3), se expuso 2 min a la luz ultravioleta y se desnaturalizó durante 90 min en una solución de NaOH 0,4 N. La transferencia a una membrana de nylon (Hybond N+, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) se realizó mediante el método Southern blot (Sambrook y cols., 1989), durante 48 h, utilizando NaOH 0,4 N como tampón de transferencia. Después se lavó durante 5 min con una solución de SSC 2x (Citrato sódico 30 mM, NaCl 0,3 M) y un lavado final de 2 min con TrisHCl 0,5 M, pH=7,0. El ADN se fijó por exposición a la luz ultravioleta durante 3 min.

El marcaje de la sonda y la hibridación se realizaron con el kit AlkPhos<sup>TM</sup> siguiendo las indicaciones del fabricante (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Para el marcaje se utilizó ADN purificado, a una concentración de 10 ng/μl, desnaturalizado por calor (95°C) durante 5 min y unido covalentemente a fosfatasa alcalina tras una incubación a 37°C durante 20 min. La hibridación se llevó a cabo con las sondas específicas obtenidas por PCR a una temperatura de 55-60°C durante 18 h, utilizando el horno Techne HB-1 (Techne Ltd, Cambridge, RU).

La detección de la señal se realizó mediante la adición de dioxetano (CDP-star Detection Reagent, GE Healthcare Bio-Sciences AB) sobre el que actúa la fosfatasa alcalina

emitiendo una señal luminiscente. Esta señal se detectó por exposición durante 24 h en placas de autoradiografía Hyperfilm-ECL (GE Healthcare Bio-Sciences AB). El revelado de las placas se realizó de manera automatizada.

## **5. CARACTERIZACIÓN DE BLEE**

Las distintas BLEE se caracterizaron por métodos que incluyen la determinación del punto isoeléctrico, amplificación y secuenciación de los genes correspondientes.

### **5.1 Detección fenotípica**

La confirmación del fenotipo productor de BLEE se llevo a cabo mediante el método de la doble difusión en disco, descrito por Jarlier y cols. (Jarlier y cols., 1998) que consiste en un antibiograma en placas de Mueller-Hinton (Oxoid Ltd.) con discos convencionales (30 µg) de cefotaxima y ceftazidima y con un disco de amoxicilina-clavulánico (20/10 µg) (Oxoid, Ltd.) colocado en el centro de la placa a una distancia de 20-30 mm de los anteriores. La aparición de un halo ampliado alrededor de los discos de cefotaxima y ceftazidima en la zona próxima al disco de amoxicilina-clavulánico, tras incubación de 18-20 h a 37°C es indicativa de una posible producción de BLEE.

### **5.2 Determinación del punto isoeléctrico**

La determinación del punto isoeléctrico se realizó por la técnica del isoelectroenfoque, que permite separar proteínas en geles de acrilamida sometidas a un gradiente de pH creciente. Las proteínas migran desde el ánodo hasta el cátodo cuando se les somete a corriente eléctrica hasta detenerse en el valor de pH dónde su carga neta es cero, siendo este valor su punto isoeléctrico. Esta es una de las técnicas que permite obtener información del posible número y el tipo de BLEE producida por cada aislado.

La determinación del punto isoeléctrico de una proteína, se lleva a cabo en 3 pasos:

#### ***a) Obtención de extractos crudos enzimáticos***

Los extractos enzimáticos se obtuvieron tras la lisis celular por sonicación o ultrasonidos (Vecoli y cols., 1983). Los extractos celulares se obtuvieron inoculando 200 µl de un cultivo de 18 h en 20 ml de caldo LB (Pronadisa) durante 6 h a 37°C en agitación. Tras alcanzar la fase exponencial, estos cultivos se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min a 4°C. Después



de eliminar el sobrenadante, las células se lavaron en 10 ml de agua destilada, centrifugándose nuevamente a 4000 rpm durante 10 min a 4°C. Tras eliminar nuevamente el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1 ml de agua destilada y se procedió a su sonicación en hielo (Sonicator W-30, Heat Systems. Ultrasonics Inc., Farmingdale, NY, EEUU), utilizando 5-7 ciclos de 2 min cada uno. El sonicado se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. La confirmación de la actividad beta-lactamasa se realizó añadiendo 3 µl de nitrocefin 100 µM (Oxoid Ltd.) y 3 µl de extracto. El cambio de color amarillo a rojo del nitrocefín confirmó la presencia de actividad enzimática.

#### ***b) Separación en gel o isoelectroenfoque***

La separación en gel de las distintas proteínas se realizó mediante la técnica descrita por Huovinen (Huovinen, 1988) utilizando geles comerciales de poliacrilamida con anfolitos de rango de pH= 3-9 y el equipo Phastsystem (Pharmacia AB, Uppsala, Suecia). El isoelectroenfoque consiste en tres fases: i) un pre-enfoque a 15°C, 75 Vh y 2000 V donde se forma el gradiente de pH; ii) aplicación automática de la muestra en el gel y iii) el enfoque a 500 Vh y 2000 V en el cual las proteínas migran hasta alcanzar su correspondiente punto isoeléctrico. Se utilizaron como controles beta-lactamasas de pI conocidos (5,9; 5,4; 7,6; 8,1).

#### ***c) Tinción del gel***

Para la visualización de las distintas bandas, el gel se tiñó con 100 µl de nitrocefin 100 µM (Oxoid Ltd.). El punto isoeléctrico de una proteína es inferido por comparación con las bandas obtenidas en los controles.

### **5.3 Caracterización de los genes *bla*<sub>BLEE</sub>**

Para la determinación de las distintas variantes de BLEE, se llevó a cabo la amplificación por PCR de los correspondientes genes, purificación, secuenciación de los productos de PCR obtenidos y análisis de las secuencias obtenidas (ver apartados 4.1.1, 4.3.1, 4.4.1-4, 4.5).

La amplificación de los distintos genes *bla*<sub>BLEE</sub> se llevó a cabo con los cebadores específicos y las condiciones que aparecen en la tabla 4. La determinación de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> se realizó primero mediante una PCR múltiple con distintos cebadores para los distintos grupos y posterior confirmación mediante una PCR simple con cebadores específicos para cada una de las familias de CTX-M.

**Tabla 4.** Cebadores y condiciones utilizados para la caracterización de los genes *bla<sub>BLEE</sub>*.

PCR	CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	CONDICIONES	REFERENCIAS
PCR MULTIPLE				
Grupo CTX-M-1 (415 pb)	CTX-M-1G-F	AAAAATCACTGCGCCAGTTC	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 25 s a 94°C, 40 s a 52°C, 50 s a 72°C; extensión final de 6 min a 72°C	Woodford y cols., 2006
	CTX-M-1G-R	AGCTTATTCATCGCCACGTT		
Grupo CTX-M-2 (552 pb)	CTX-M-2G-F	CGACGCTACCCCTGCTATT		
	CTX-M-2G-R	CCAGCGTCAGATTTTTCAGG		
Grupo CTX-M-9 (205 pb)	CTX-M-9G-F	CAAAGAGAGTGCAACGGATG		
	CTX-M-9G-R	ATTGGAAAGCGTTTCATCACCC		
PCR SIMPLE				
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> (1.076 pb)	TEM-F	ATAAAATTCCTTGAAGAC	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Mabilat y cols., 1995
	TEM-R	TTACCTGCTTAATC		
<i>bla</i> <sub>SHV</sub> (930 pb)	SHV-F	GGGTTATTCTTATTGTGCG	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Rasheed y cols., 1997
	SHV-R	TTAGCGTTGCCAGTGCTC		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> (800 pb)	P1	ATGGTTAAAAAATCACTGGGCC	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 62°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Wang y cols., 2003
	P2b	TCCCGACGGCTTTCGCGCTT		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub> (1.000 pb)	CTX-M-10-F	CTGGGGATTGCGTTTGAAC	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 59°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Coque y cols., 2002 Oliver y cols., 2001
	CTX-M-10-R	TTACAAAACCGTTGGTGACG		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> (800 pb)	P3	ATGATGACTCAGAGCATTCG	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Wang y cols., 2003
	P2b	TCCCGACGGCTTTCGCGCTT		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> (856 pb)	CTX-M-9-F	GTGACAAAAGAGAGTGCAACGG	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 62°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Coque y cols., 2002 Simarro y cols., 2000
	CTX-M-9-R	ATGATTCTACGCCGCTGAAGCC		

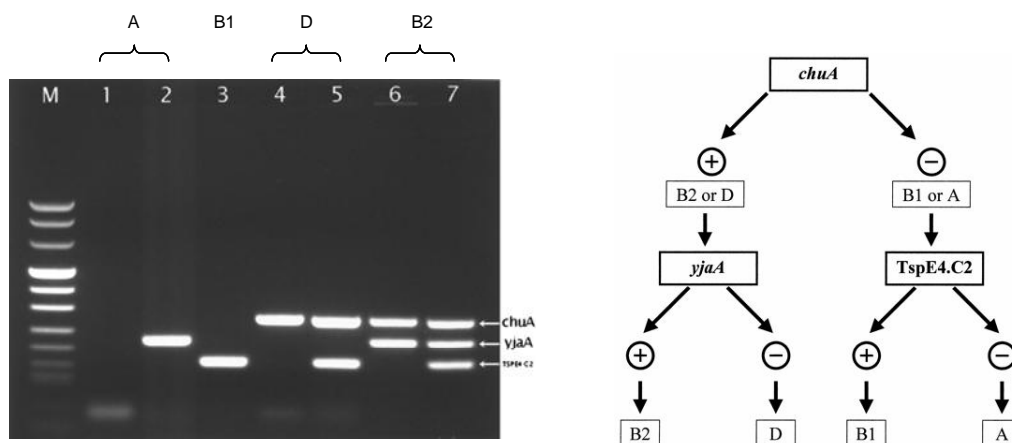
## 6. ESTRUCTURA POBLACIONAL

La caracterización de la estructura poblacional de los aislados de *E. coli* y de *K. pneumoniae* productores de BLEE se realizó mediante su clasificación en distintos grupos filogenéticos y el análisis de clonalidad mediante PFGE y MLST utilizando los esquemas descritos para cada especie bacteriana.

### 6.1 Grupos filogenéticos

#### 6.1.1 *E. coli*

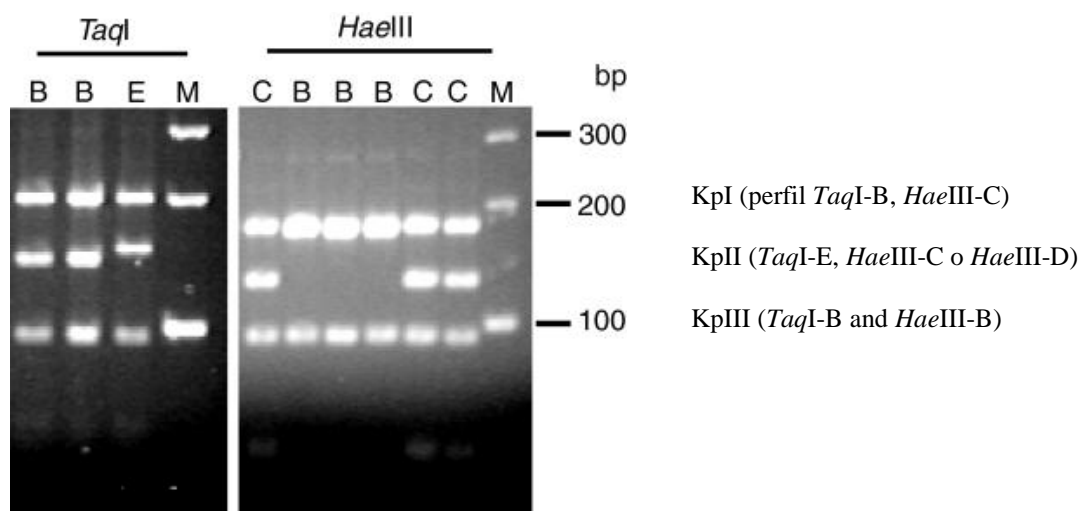
La clasificación de los aislados de *E. coli* en los distintos grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) se realizó mediante el método descrito por Clermont y cols. que consiste en la amplificación de los genes *chuA*, *yja* y de un fragmento de ADN denominado TspE4C2 (Clermont y cols., 2000, Figura 10). Los detalles del procedimiento utilizado se describen en los apartados 4.1.1, 4.3.1 y 4.4.1-3. Los oligonucleótidos y las condiciones de PCR utilizadas se especifican en la tabla 5.



**Figura 10.** Identificación de los grupos filogenéticos de *E. coli* según el esquema descrito por Clermont y cols. (adaptado de Clermont y cols., 2000).

### 6.1.2 *K. pneumoniae*

La clasificación de los aislados de *K. pneumoniae* en los diferentes grupos filogenéticos se realizó siguiendo el protocolo descrito por Brisse y cols. que consiste en la amplificación del gen *gyrA* seguida de una restricción del producto de PCR con las enzimas *TaqI* y *HaeIII* (TaKaRa Bio Inc.). Los diferentes patrones de restricción obtenidos con cada una de las enzimas y su combinación permiten la clasificación en uno de los tres grupos filogenéticos, KpI, KpII y KpIII (Brisse y cols., 2004; Figura 11).



**Figura 11.** Identificación de los grupos filogenéticos de *K. pneumoniae* (adaptado de Brisse y cols., 2004).

La obtención del ADN genómico y la amplificación, digestión, separación y visualización se llevó a cabo según se describe en los puntos 4.1.1, 4.2, 4.3 y 4.4.1-3. Las condiciones de digestión fueron incubación durante 18 h a 37°C para *HaeIII* y a 65°C para *TaqI*, respectivamente. La reacción de PCR se realizó con los cebadores y condiciones especificados en la tabla 5.

**Tabla 5.** Cebadores y condiciones utilizados para la caracterización de los grupos filogenéticos de los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE.

PCR	CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	CONDICIONES	REFERENCIAS
<b>Grupos filogenéticos <i>E. coli</i></b>				
<b>PCR MULTIPLE</b>				
<i>chuA</i> (279 pb)	<i>chuA.1</i> <i>chuA.2</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAAGACA		
<i>yjaA</i> (211 pb)	<i>yjaA.1</i> <i>yjaA.2</i>	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, y 30 s a 72°C; extensión final de 7 min a 72°C	Clermont y cols., 2000
TspE4C2 (152 pb)	TspE4C2.1 TspE4C2.2	GAGTAATGTCGGGGGCATTCA CGGCCCAACAAAGTATTACG		
<b>Grupos filogenéticos <i>K. pneumoniae</i></b>				
<i>gyrA</i> (441 pb)	<i>gyrAA</i> <i>gyrAC</i>	CGCGTACTATACGCCATGAACGTA ACCGTTGATCACTCGGTCAGG	1 ciclo de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 30 s a 50°C, y 30 s a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	Brisse y cols., 2004

## 6.2 Electroforesis en geles de campo pulsado (PFGE)

Para determinar la relación clonal existente entre las distintas cepas se llevó a cabo una electroforesis en geles de campo pulsado (PFGE) mediante el protocolo modificado de Kaufmann, según lo especificado en los apartados 4.1.1, 4.2 y 4.4.2-3 (Kaufmann y cols., 1998).

La digestión del ADN en bloques de agarosa se realizó con 30 U de la enzima *XbaI* (TaKaRa Bio Inc.) y con incubación a 37°C durante 20 h. La relación clonal entre los aislados se estableció por comparación visual de los patrones obtenidos aplicando los criterios previamente establecidos (Tenover y cols., 1995), que permiten clasificar los aislados en indistinguibles (sin diferencia de bandas); clonalmente relacionados (entre 1 y 3 bandas de diferencia); posiblemente relacionados clonalmente (4 y 6 bandas de diferencia); no relacionados clonalmente (más de 7 bandas de diferencia).

## 6.3 Multilocus sequence typing (MLST)

Esta técnica consiste en amplificar y comparar las secuencias de siete genes de mantenimiento celular (“housekeeping”) asignando un número a cada alelo. Las distintas combinaciones de alelos se asignaron con su correspondiente secuencia tipo (ST) según las bases de datos correspondientes a cada microorganismo. Se determinó la relación clonal en los aislados de *E. coli* productores de CTX-M-14 y SHV-12 y en una selección de aislados de *K. pneumoniae*.

### 6.3.1 *E. coli*

Se seleccionaron aislados representativos productores de CTX-M-14 (n=49) y SHV-12 (n=23) para su caracterización por MLST. El esquema de MLST seguido en esta tesis se encuentra disponible en <http://mlst.ucc.ie/> (Wirth y cols., 2006). Los genes utilizados fueron: *adk* (adenilato quinasa), *fumC* (fumarato hidratasa), *gyrB* (ADN girasa), *icd* (isocitrato/isopropilmalato deshidrogenasa), *mdh* (malato deshidrogenasa), *aroE* (shikimato deshidrogenasa), *purA* (adenilosuccinato deshidrogenasa), *recA* (motivo de unión de ATP/GTP). Los cebadores y las condiciones utilizados se encuentran en la tabla 6. Los procedimientos utilizados se describen en 4.1.1, 4.3, 4.4.1-3, 4.5 y 4.6.

### 6.3.2 *K. pneumoniae*

Una selección de aislados clínicos (n=40) productores de las BLEE más relevantes en esta especie en nuestro centro (TEM-4, SHV-12, CTX-M-10 y CTX-M-15), se caracterizaron por MLST según el esquema descrito por Diancourt y cols (Diancourt y cols., 2005). Dicho esquema se basa en la amplificación de los siguientes genes “housekeeping”: *rpoB* (subunidad beta ARN polimerasa), *gapA* (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa), *mdh* (malato deshidrogenasa), *pgi* (fosfoglucoisomerasa), *phoE* (fosforina E), *infB* (factor iniciador de la traducción 2), *tonB* (transductor de energía periplásmico). (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>).

Los cebadores y condiciones utilizados se muestran en la tabla 6. La obtención del ADN, amplificación, electroforesis, visualización, purificación, secuenciación de los productos obtenidos, así como el análisis posterior de las secuencias y de los resultados de MLST se llevó a cabo como se indica en los puntos 4.1.1, 4.3.1, 4.4.1-3, 4.5 y 4.6.

**Tabla 6.** Cebadores y condiciones utilizados para la caracterización por MLST de aislados de *E.coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE.

PCR	CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	CONDICIONES	REFERENCIAS
MLST <i>E. coli</i> <i>adK</i> (583 pb)	<i>adK</i> -F	ATTCTGCTTGGCGCTCCGG	1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 54°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	Wirth y cols., 2006
	<i>adK</i> -R	CCGTCAACTTTTCGCGTATTT		
	<i>icd</i> -F	ATGGAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA		
	<i>icd</i> -R	GGACGCAGCAGGATCTGTT		
	<i>purA</i> -F	TCGGTAAACGGTGTGTGCTG		
	<i>purA</i> -R	CATACGGTAAGCCACGCAGA		
	<i>fimC</i> -F	TCACAGGTCCGCCAGCGCTTC		
	<i>fimC</i> -R	GTACGCAGCGAAAAAGATTC		
	<i>recA</i> -F	ACCTTTGTAGCTGTACACG		
	<i>recA</i> -R	TCGTCGAAATCTACGGACCGGA		
MLST <i>K. pneumoniae</i>	<i>gyrB</i> (911 pb)	TCGGCGACACGGATGACGGC	1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 58°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	Diancourt y cols., 2005
	<i>gyrB</i> -R	ATCAGGCTTCACGGGCATC		
	<i>mdh</i> -F	ATGAAAGTCGAGTCTCGGCGTGTGTCGGG		
	<i>mdh</i> -R	TTAACGAACTCTGTGCCCCAGAGGATATCTTTCTT		
	<i>rpoB</i> -F	GGCGAAATGGCWGAGAACCA		
	<i>rpoB</i> -R	RGAGTCTTCGAAAGTTGTAACC		
	<i>mdh</i> -F	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG		
	<i>mdh</i> -R	CCGTTTTTCCCCCAGCAGCAG		
	<i>pgi</i> -F	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGTGTCGGC		
	<i>pgi</i> -R	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT		
MLST <i>K. pneumoniae</i>	<i>phoE</i> -F	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 50°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	Diancourt y cols., 2005
	<i>phoE</i> -R	TGATCAGAACTGGTAGGTGAT		
	<i>infB</i> -F	CTCGCTGCTGGACTATATTCG		
	<i>infB</i> -R	CGCTTCAGCTCAAGAACTTC		
	<i>gapA</i> -F	TGAAATATGACTCCACTCACGG		
	<i>gapA</i> -R	CTTCAGAAAGCGGCTTTGATGGCTT		
	<i>tonB</i> -F	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT		
	<i>tonB</i> -R	ATTCGCCGGCTGRCRGAGAG		
	<i>gapA</i> (450 pb)			
	<i>tonB</i> (414 pb)			



## 7. TRANSFERENCIA DE LOS GENES *bla*<sub>BLEE</sub>

El método utilizado para la transferencia *in vitro* de los genes *bla*<sub>BLEE</sub> fue la conjugación tanto en medio sólido como líquido. La cepa utilizada como receptora en ambos casos es *E.coli* BM21 (resistente al ácido nalidíxico y a la rifampicina, lactosa positiva y libre de plásmidos).

### 7.1 Conjugación en medio sólido

Se partió de un cultivo en caldo LB de 18 h de las cepas donadoras y receptora. Dichos cultivos se diluyeron 1:100 en caldo LB y se pusieron en contacto las cepas receptoras y donadoras en una proporción 1:2. La mezcla se centrifugó a 6.000 rpm durante 15 min y las células se resuspendieron en 100 µl de caldo LB. Se inoculó a un filtro (Millipore, Billerica, MA, EEUU) colocado sobre una placa de agar LB que actuó como soporte sólido y nutricional que fue incubada durante 18 h a 37°C. Posteriormente, se realizaron diluciones ( $10^{-1}$ - $10^{-6}$ ) en caldo LB del cultivo y se plaquearon 25 µl de cada una de ellas en placas de agar LB suplementado con los antibióticos correspondientes: cefotaxima o ceftazidima (2 µg/ml) en el caso de las células donadoras y cefotaxima o ceftazidima (2 µg/ml) y rifampicina (100 µg/ml) para los transconjugantes. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 h. Como confirmación, los cultivos positivos se reestriaron en las placas de selección correspondientes. Los transconjugantes obtenidos se guardaron en glicerol al 40% a -20°C.

### 7.2 Conjugación en medio líquido

Partiendo de una placa de cultivo de LB de 24 h, se cultivó un inóculo bacteriano en 5 ml de caldo LB, tanto de las cepas donadoras como de las receptoras, y se incubaron a 37°C durante 18 h sin agitación. Se preparó un inóculo del cultivo anterior poniendo en contacto la cepa donadora y receptora en una proporción de 1:2, se incubó durante 6 h a 37°C sin agitación. Se hicieron las correspondientes diluciones seriadas ( $10^{-1}$ -  $10^{-2}$ ) y se plaquearon además del cultivo sin diluir 100 µl en sendas placas de medio selectivo (MacConkey; Oxoid, Ltd.) suplementado con cefotaxima o ceftazidima (2 µg/ml) y rifampicina (100 µg/ml). Las colonias crecidas se reestriaron en el medio selectivo correspondiente para confirmar la obtención de transconjugantes. Los transconjugantes obtenidos, se guardaron en glicerol al 40% a -20°C.

## 8. LOCALIZACIÓN DE LOS GENES *bla*<sub>BLEE</sub>

La localización cromosómica o plasmídica de los genes *bla*<sub>BLEE</sub> se determinó por hibridación de ADN digerido con *I-CeuI* o *S1* nucleasa, transferido por el método de Southern blot (ver 4.7). La obtención del ADN, su digestión, electroforesis y visualización se detallan en los puntos 4.1, 4.2, 4.4.2 y 4.4.3. En el caso de la digestión con *I-CeuI* se utilizaron 6 U de la enzima y para *S1* nucleasa 12 U. Los cebadores y condiciones utilizados para la síntesis de sondas se encuentran en la tabla 7.

**Tabla 7.** Cebadores y condiciones utilizados para la síntesis de sondas.

PCR	CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	CONDICIONES	REFERENCIAS
<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> (856 pb)	CTX-M-9-F CTX-M-9-	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG ATGATTCTACGCCGCTGAAGCC	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 62°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Simarro y cols., 2000 Coque y cols., 2002
<i>bla</i> <sub>SHV</sub> (930 pb)	SHV-F SHV-R	GGGTTATTCTTATTGTGCGC TTAGCGTTGCCAGTGCTC	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Rasheed y cols., 1997
16S rADN (1.533 pb)	16S rADN-F 16S rADN-R	AGAGTTTGATCATGGCTCAG AAGGAGGTGATCCAGCC	1 ciclo de 5 min a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 54°C, 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Weisburg y cols., 1991

La enzima *I-CeuI* reconoce dianas de restricción de ADN cromosómico correspondientes a regiones específicas del operón 23S de genomas bacterianos. La sonda 16S rADN hibrida solamente con fragmentos de ADN cromosómico. Una hibridación positiva de la sonda 16S rADN y de la sonda del gen *bla*<sub>BLEE</sub> en el mismo fragmento indica la localización cromosómica del gen de la beta-lactamasa. Una hibridación positiva de la sonda *bla*<sub>BLEE</sub> en bandas que no hibridan con la sonda 16S rADN indica una localización plasmídica.

En el caso de ADN digerido con *S1* nucleasa, la hibridación de la sonda *bla*<sub>BLEE</sub> en uno de los fragmentos generados tras la digestión enzimática será indicativo de localización plasmídica, además de indicarnos el tamaño de dicho plásmido.

## 9. CARACTERIZACIÓN DE LOS ELEMENTOS DE TRANSFERENCIA HORIZONTAL

La caracterización de los elementos de transferencia horizontal incluyó los plásmidos y los entornos genéticos de *bla*<sub>CTX-M-2</sub> y de *bla*<sub>CTX-M-14</sub>.

### 9.1 Estudio de plásmidos

La caracterización de plásmidos incluyó la determinación del número y tamaño, identificación del grupo de incompatibilidad, análisis de ARNi, replicasas, relaxasas y análisis de los patrones de restricción obtenidos por digestión enzimática.

#### 9.1.1 Extracción de plásmidos

Los plásmidos se obtuvieron mediante los métodos de lisis alcalina de Birnboim y Doly y el método de Barton (ver apartado 4.1.1 y 4.1.2).

#### 9.1.2 Determinación del número y tamaño

Para visualizar el tamaño y número de los plásmidos de las cepas transconjugantes obtenidas se utilizó: i) el método de Kado y Liu (ver 4.1.2, 4.4.1 y 4.4.3). El número y tamaño de los plásmidos se obtuvo por comparación con plásmidos de las cepas control *E. coli* V517 (ocho plásmidos comprendidos entre 2,1 y 54,2 Kb) y *E. coli* NCTC 50192 (plásmidos de 7, 38, 66 y 154 Kb) y ii) el método de Barton dónde el tamaño y el número de plásmidos se establece por comparación con los marcadores de peso molecular utilizados de la movilidad electroforética de las formas lineales después de la digestión con S1 nucleasa (12 U) y de su separación mediante PFGE (4.1.2, 4.2, 4.4.2, 4.4.3, 4.6).

#### 9.1.3 Análisis del perfil plasmídico

Para determinar las relaciones entre los distintos perfiles de plásmidos se realizaron distintas digestiones con las enzimas *EcoRI*, *PstI* y *HpaI* (TaKaRa Bio Inc, Shiga, Japón) en las condiciones indicadas por el fabricante. La obtención del DNA, la separación de los fragmentos y su visualización se describen en los puntos 4.1.2, 4.2, 4.4.1 y 4.4.3. Los patrones obtenidos se compararon para determinar si los plásmidos estaban o no relacionados

genéticamente. No existen criterios que determinen cuál es el número de bandas que tienen que compartir dos plásmidos para que se consideren idénticos.

#### **9.1.4 Determinación de los grupos de incompatibilidad**

Los plásmidos portadores de los genes *bla<sub>BLEE</sub>* se clasificaron en relación a su grupo de incompatibilidad siguiendo el esquema de PCR establecido por Carattoli y cols. (Carattoli y cols., 2005). Este esquema permite la identificación de 18 replicones básicos representativos de los plásmidos de enterobacterias e incluye 5 PCR múltiples y 3 simples. Los cebadores y condiciones utilizados se muestran en la tabla 8. Para la amplificación, se utilizó como molde ADN plasmídico obtenido por el método de Birnboim y Doly (ver 5.1.2). El procedimiento seguido se describe en los puntos 4.3.1, 4.4.1, 4.4.3 y 4.5. La correspondencia entre el replicón descrito y el plásmido que lleva el gen *bla<sub>BLEE</sub>* se realizó mediante hibridación con sondas rep específicas (ver 4.7) de ADN digerido con S1 nucleasa o I-*CeuI* o con *PstI* (New England Biolabs, Inc.) transferido por el por el método Southern blot. La coincidencia de señal entre la hibridación de la sonda del gen *bla<sub>BLEE</sub>* y de la sonda rep en el mismo fragmento de ADN mostró la asociación entre ambos.

**Tabla 8.** Cebadores y condiciones utilizados para la caracterización de plásmidos.

PCR	CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	CONDICIONES	REFERENCIA
Grupos incompatibilidad				
PCR múltiple				
H11 (471 pb)	H11-F	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30 s a 60°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	Carattoli y cols., 2005
	H11-R	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA		
H12 (644 pb)	H12-F	TTTCTCTGAGTCACCTGTTAAACAC		
	H12-R	GGCTCACTACCGTTGTCTATCCT		
I1 (139 pb)	I1-F	CGAAAGCCGGACGGCAGAA		
	I1-R	TCGTCTCCGCCAAGTTCGT		
X (376 pb)	X-F	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT		
	X-R	TGAGAGTCAATTTTATCTCATGTTTAGC		
L/M (785 pb)	L/M-F	GGATGAAAACTATCAGCATCTGAAG		
	L/M-R	CTGCAGGGCGGATTCTTAGG		
N (559 pb)	N-F	GTCTAAGAGCTTACCGAAG		
	N-R	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC		
F1A (462 pb)	F1A-F	CCATGCTGGTCTAGAGAAAGGTG		
	F1A-R	GTATATCTCTTACTGGCTTCCGCAG		
F1B (702 pb)	F1B-F	GGAGTTCTGACACAGCATTTTCTG		
	F1B-R	CTCCGTCGCTTCAGGGCAAT		
W (242 pb)	W-F	CCTAAGAAACAACAAGCCCCCG		
	W-R	GGTGGCGGCATAGAACCGT		
Y (765 pb)	Y-F	AATTCAAAACAACACTGTGCAGCCTG		
	Y-R	GCGAGAAATGGACGATTACAAAACCTTT		
P (534 pb)	P-F	CTATGGCCCTGCAAAACGCGCCAGAAA		
	P-R	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC		
F1C (262 pb)	F1C-F	GTGAAGTGGCAGATGAGGAAAG		
	F1C-R	TTCTCTCGTCGCCAACTAGAT		
A/C (465 pb)	A/C-F	GAGAACCAAGACAAAGACCTGGA		
	A/C-R	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT		
T (750 pb)	T-F	TTGGCTGTTTGTGCCTAAACCAT		
	T-R	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC		
F1As (270 pb)	F1As-F	CTGTGTAAGCTGATGGC		
	F1As-R	CTCTGCCACAAACTTCAGC		
PCR simple				
K (160 pb)	K-F	GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30 s a 60°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	
	K-R	TCTTTACAGAGCCCGCCAAA		
B/O (159 pb)	B/O-F	GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30 s a 52°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C	
	B/O-R	TCTGGGTTCCGCCAAGTTCGA		
F (270 pb)	F-F	TGATCGTTTAAGGAATTTTG		
	F-R	GAAGATCAGTCACACCATCC		

### 9.1.5 Caracterización de la región de replicación

Los plásmidos clasificados dentro del complejo IncI (IncI, IncK y/o IncB/O) mediante el esquema de PCR descrito por Carattoli y cols. (Carattoli y cols., 2005) fueron analizados en detalle mediante la caracterización de ARNi, las replicasas y las relaxasas correspondientes.

**La identificación de ARNi**, también conocido como *inc*, que codifica para una molécula de ARN de aproximadamente 70 pb que regula la replicación reprimiendo la expresión del gen de la replicasa, se realizó mediante el análisis de las secuencias obtenidas por el método de tipado de replicones por PCR (Carattoli y cols., 2005).

**La identificación de las replicasas** se llevó a cabo amplificando los genes correspondientes con los cebadores RNAI y REPZA (Tabla 9) que fueron diseñados utilizando las secuencias consenso de los plásmidos IncI: pO113 (GenBank NC\_007365), R64 (GenBank NC\_005014), ColIb-P9 (GenBank NC\_002122); IncK: R387 (GenBank M93063) e IncB: pMU707 (GenBank M93062). El protocolo seguido se muestra en los puntos 4.1.2, 4.3.1, 4.4.1, 4.4.2, 4.5 y 4.6.

**La caracterización de las relaxasas** se realizó mediante la amplificación de dichos genes utilizando los oligonucleótidos MOB<sub>P12</sub>-F y MOB<sub>P12</sub>-R, con las condiciones que se encuentran en la tabla 9. La amplificación, purificación, secuenciación y posterior análisis se llevo a cabo siguiendo el protocolo descrito en 4.3, 4.4 y 4.5 (Alvarado y cols., 2008 International Plasmid Biology Conference).

El árbol filogenético de las replicasas y relaxasas se realizó mediante el método neighbour-joining, usando el modelo p-distance con delección completa, y comprobado por medio de los valores de bootstrap obtenidos a partir de 1000 réplicas, utilizando el programa MEGA versión 3.1 (Kumar y cols., 2004).

**Tabla 9.** Cebadores y condiciones utilizados en la caracterización de replicasas y relaxasas de los plásmidos del complejo IncI.

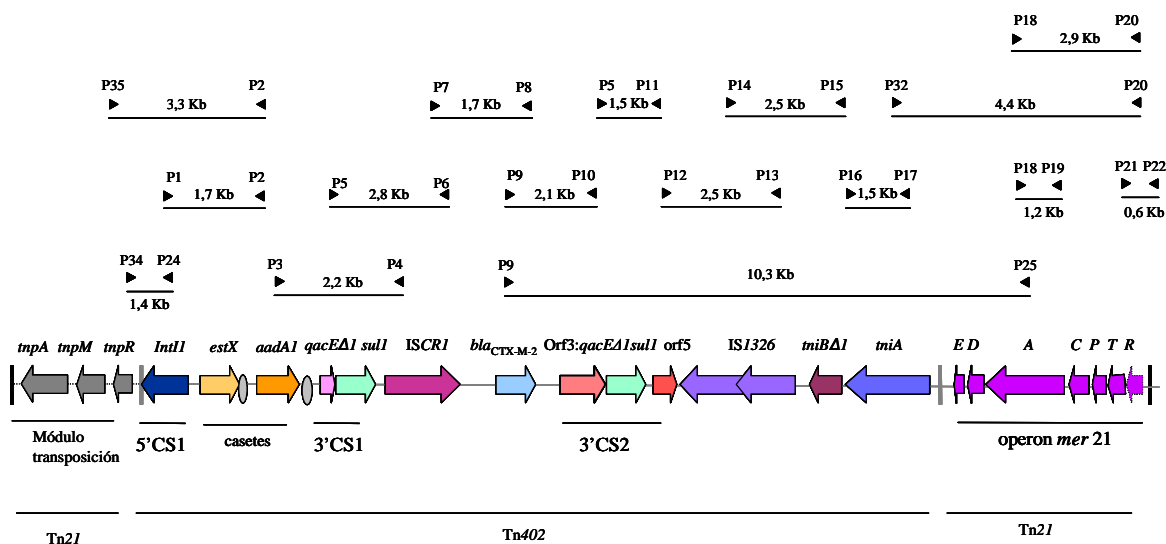
PCR	CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	CONDICIONES	REFERENCIAS
<b>Replicasas</b>	RNAI	ATGCGCCATAAGGCATTCA	1 ciclo de 5 min a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 54°C, 2 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Valverde y cols., 2009
	REPZA	ATGACCATCTGAAGCGACT		
<b>Relaxasas</b>	MOBP12-F MOBP12-R	GCAAAAGATGACACTGAYCCYGT AGCGATGTGGATGTGAAGGTTATCHGTRTC	1 ciclo de 5 min a 94°C, 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 54°C, 30 s a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Alvarado y cols., 2008

## 9.2 Caracterización del entorno genético de *bla*<sub>CTX-M</sub>

La asociación de los integrones que contienen los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> de distintos grupos (*bla*<sub>CTX-M-2</sub> y *bla*<sub>CTX-M-9</sub>) con transposones de la familia Tn21 y su localización en integrones de clase 1 ha sido descrita por diversos autores (Arduino y cols., 2002; Navarro y cols., 2007a; García y cols., 2005; Novais y cols., 2006; Power y cols., 2005; Sabaté y cols., 2002b). También se ha descrito la asociación de otras BLEE con secuencias de inserción, como en el caso de *ISEcp1* e *IS903* con CTX-M-14 (Chanawong y cols., 2002; Eckert y cols., 2006; Lartigue y cols., 2004).

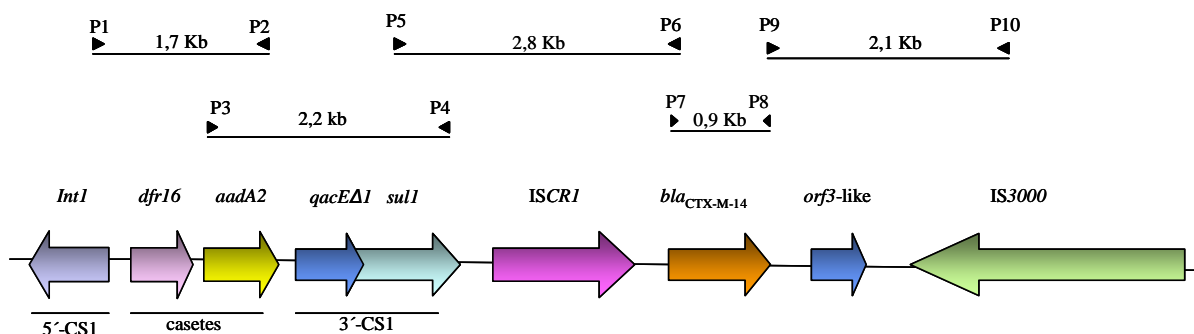
### 9.2.1 Asociación con *ISCR1* e integrones

La caracterización del entorno genético *bla*<sub>CTX-M-2</sub> se llevó a cabo mediante una estrategia de PCR solapantes utilizando cebadores diseñados sobre las secuencias de In35 (GenBank AY079169), In60 (GenBank AY092058) y Tn21 (GenBank AF071413) (Figura 12).



**Figura 12.** Esquema de PCR solapantes para la caracterización del entorno genético de *bla*<sub>CTX-M-2</sub>.

La presencia de *bla*<sub>CTX-M-14</sub> en integrones de clase 1 y su asociación con transposones del tipo Tn21 se caracterizó mediante un esquema de PCR solapantes (Figura 13), basadas en las secuencias de In60 (GenBank AF174129).



**Figura 13.** Esquema de PCR solapantes para la caracterización del entorno genético de *bla*<sub>CTX-M-14</sub> asociado a integrones de clase 1 e *ISCR1*.

En ambos casos, se utilizó como molde ADN genómico de la cepa salvaje. Se siguieron los procedimientos de extracción, amplificación, separación, visualización, purificación, secuenciación y análisis descritos en 4.1.1, 4.3.1, 4.3.2, 4.4.1, 4.4.3, 4.5 y 4.6. Los cebadores y las condiciones de PCR utilizados se muestran en la tabla 10.

### 9.2.2 Asociación con *ISEcp1*

Se analizó la presencia de *ISEcp1* y de *IS903* asociadas a *bla*<sub>CTX-M-14</sub>. Los cebadores utilizados y las condiciones se muestran en la tabla 11. La obtención de ADN, la reacción de PCR, la electroforesis, visualización, purificación, secuenciación y análisis se describen en los puntos 4.1, 4.3.1, 4.4.1, 4.4.3, 4.5 y 4.6.

## 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significación estadística se calculó utilizando el método de Chi-cuadrado, considerándose como valores estadísticamente significativos aquellos con  $p \leq 0,05$ .



**Tabla 10.** Cebadores y condiciones utilizados en la caracterización del entorno genético de *bla*<sub>CTX-M-2</sub>.

PCR	CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	CONDICIONES	REFERENCIAS
<b>Caracterización de integrones</b>				
<i>Int1</i>	<i>Int1</i> -F <i>Int1</i> -R	GGGTCAAGGATCTGGATTTCG ACATGCGTGTAAATCATCGTCG	1 ciclo de 12 min a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 62°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 8 min a 72°C.	Mazel y cols., 2000
P1-P2 (1,7 Kb)	P1 (5'CS) P2 (3'CS)	GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCTGAT	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C.	Levesque y cols., 1995
P3-P4 (2,2 Kb)	P3 ( <i>aadA</i> /F) P4 (ORF513rF1R)	GCTGGCCGTGCATTGTACG GAGCTCTGCACCATCCAC	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, y 1 min 30s a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Valverde y cols., 2006
P5-P6 (2,8 Kb)	P5 ( <i>qacEΔ2</i> ) P6 (ORF513R)	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT CTCGCTTGAGGCGTTGCAT	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C, y 3 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C.	Valverde y cols., 2006
P7-P8 (1,7 Kb)	P7 (ORF513-4) P8 (CTX-M-2R/P2b)	ATGCAACGCCTCAAGCGAG TCCCGACGGCTTCCGCCTT	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, y 1 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C.	Valverde y cols., 2006 Wang y cols., 2003
P9-P10 (2,1 Kb)	P9 (CTX-M-2F/P3) P10 ( <i>qacEΔ1B</i> )	ATGATGACTCAGAGCATTTCG CAAGCTTTTGCCCATGAAGC	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C, y 2min 30 s a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C.	Valverde y cols., 2006 Wang y cols., 2003
P5-P11 (1,5 Kb)	P5 ( <i>qacEΔ1</i> ) P11 ( <i>orf5</i> R)	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT AGTTCTAGGCGTTCTGCG	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C, y 1 min 30 s a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C.	Valverde y cols., 2006
P12-P13 (2,5 Kb)	P12 ( <i>orf5</i> -F) P13 (IS1326-F)	CGATATCGACGAGGTTGTGC ACTGTCATAGCGGTTACGTT	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C, y 2 min 30 s a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C.	Valverde y cols., 2006
P14-P15 (2,5 Kb)	P14 (IS1326-R) P15 ( <i>miBΔ1</i> -F)	TACCGGGTCTTATGACCGAGT AGGTGGACAGGTCGATGAT	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, y 3 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C.	Valverde y cols., 2006

Tabla 10. Continuación.

PCR	CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	CONDICIONES	REFERENCIAS
<b>Caracterización de integrones</b>				
P16-P17 (1,5 Kb)	P16 ( <i>tniB11-R</i> ) P17 ( <i>tniAF</i> ):	ATCATCGACCTGTCTCCACCT TCGTGCGGAGATCATCAGTCC	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 60°C, y 3 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Valverde y cols., 2006
<b>Caracterización de Tn2I</b>				
P18-P19 (1,2 Kb)	P18 ( <i>merA1</i> ) P19 ( <i>merA5</i> )	ACCATCGGGGGCACCTGCGT ACCATCGTCAGGTAGGGGAACAA	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 65°C, y 3 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Liebert y cols., 1996
P18-P20 (2,9 Kb)	P18 ( <i>merA1</i> ) P20 ( <i>merR1</i> )	ACCATCGGGGGCACCTGCGT GCGGATTGGCTCCACGTTGA	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 60°C, y 3 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Liebert y cols., 1996
P21-P22 (0,6 Kb)	P21 ( <i>merT1</i> ) P22 (Tn2/IR/38)	CCAGGCAGCAGGTCGATGCAAG GGGCACCTCAGAAAAACGGAAA	1 ciclo de 12 min a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C, y 3 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Liebert y cols., 1996 Mazel y cols., 2000
P23-P24 (1,4 Kb)	P23 ( <i>TnpR</i> Tn2I) P24 ( <i>intF1</i> )	ATGCTATGCACCAACCAACGG GGGTCAAGGATCTGGATTTCG	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 60°C, y 3 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Mazel y cols., 2000 Valverde y cols., 2006
P9-P25 (10,3 Kb)	P9(CTX-M-2F/P3) P25 ( <i>merA6</i> )	ATGATGACTCAGAGCATTCG GCCGACCAAGTTGTTCCCTACCTGACG	1 ciclo de 1 min a 94°C; 35 ciclos de 20 s a 96°C, 1 min a 60°C, y 5 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Wang y cols., 2003 Liebert y cols., 1996 Valverde y cols., 2006
P32-P20 (4,4 Kb)	P32 ( <i>tniAR</i> ) P20 ( <i>merT1</i> )	GGACTGATGATCTCCGCACGA CCAGGCAGCAGGTCGATGCAAG	1 ciclo de 1 min a 94°C; 35 ciclos de 20 s a 96°C, 1 min a 62°C, y 5 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Liebert y cols., 1996 Valverde y cols., 2006
P35-P2 (3,3 Kb)	P2 (3'CS) P35 (IRIn2F)	AAGCAGACTTGACCTGAT TTTCAGAAAGACGGCTGCACTG	1 ciclo de 1 min a 94°C; 35 ciclos de 20 s a 94°C, 1 min a 61°C, y 3 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Levesque y cols., 1995 Mazel y cols., 2000 Valverde y cols., 2006
P34-P24 (1,4 Kb)	P34 ( <i>TnpR-R</i> ) P24 ( <i>intF1</i> )	CCGTGGTGGTGATAGCAT GGGTCAAGGATCTGGATTTCG	1 ciclo de 10 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 62°C, y 3 min a 72°C; extensión final de 10 min a 72°C	Mazel y cols., 2000 Valverde y cols., 2006

**Tabla 11.** Cebadores y condiciones utilizados para la caracterización de las estructuras genéticas asociadas a *bla*<sub>CTX-M-14</sub>.

PCR	CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	CONDICIONES	REFERENCIAS
<b>Caracterización de In60</b>				
P1-P2 (1,7 Kb)	P1 (5'CS) P2 ( <i>aadA2</i> -R)	GGCATCCAAGCAGCAAG TGACTTGATGATCTCGCC	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 52°C, y 2 min 30s a 72°C; extensión final de 10min a 72°C	Novais y cols., 2006
P3-P4 (2,2Kb)	P3 ( <i>aadA2</i> -F) P4 ( <i>sulI</i> -R)	GCTGGCCGTGCATTTGTACG GCAAGGCGGAAACCCGCG	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C, y 2 min 30s a 72°C; extensión final de 10min a 72°C	Novais y cols., 2006
P5-P6 (2,8Kb)	P5 ( <i>sulI</i> -F) P6 (CTX-M-9-Rf)	GCGCGGGTTTCCGCCTTGGGA CCGTTGCACCTCTCTTTGTCA	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C, y 2 min 30s a 72°C; extensión final de 10min a 72°C	Novais y cols., 2006
P7-P8 (1,7Kb)	P7 (CTX-M-9-F) P8 (CTX-M-9-R)	GTGACAAAAGAGAGTGCAACGG ATGATTCTACGCCGCTGAAGCC	1 ciclo de 12min a 94°C; 35 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 62°C, 1min a 72°C; extensión final de 10min a 72°C	Simarro y cols., 2000 Coque y cols., 2002
P9-P10 (2,1Kb)	P9 (CTX-M-9-Fr) P10 ( <i>impA</i> -R)	GGCTTCAGCGGGCGAGAATCAT CGCTCAATCGAGGGGATATTAC	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 58°C, y 2min 30s a 72°C; extensión final de 10min a 72°C	Novais y cols., 2006
<b>Secuencias de inserción</b>				
<b>Presencia de <i>ISEcpI</i> e <i>IS903</i></b>				
<i>ISEcpI</i> (1,4 Kb)	<i>ISEcpI</i> -F <i>ISEcpI</i> -R	ATCTAACATCAAATGCAGG AGACTGCTTCTCACACAT	1 ciclo de 10min a 94°C; 35 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 59°C, 2 min a 72°C; extensión final de 10min a 72°C	Eckert y cols., 2006
<i>ISEcpI</i> - <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> (1,5 Kb)	<i>ISEcpI</i> -FM CTX-M-9-R	TGTCGTATCTCGCGTACTGAA ATGATTCTACGCCGCTGAAGCC	1 ciclo de 10min a 94°C; 35 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 58°C, 2min a 72°C; extensión final de 10min a 72°C	Eckert y cols., 2006
<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> - <i>IS903</i> (600 pb)	CTX-M-9-Fr <i>IS903</i> -R	GGCTTCAGCGGGCGAGAATCAT CCGTAGCGGGTGTGTTTTTC	1 ciclo de 10min a 94°C; 35 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 54°C, 1min a 72°C; extensión final de 10min a 72°C	Eckert y cols., 2006

## **RESULTADOS**



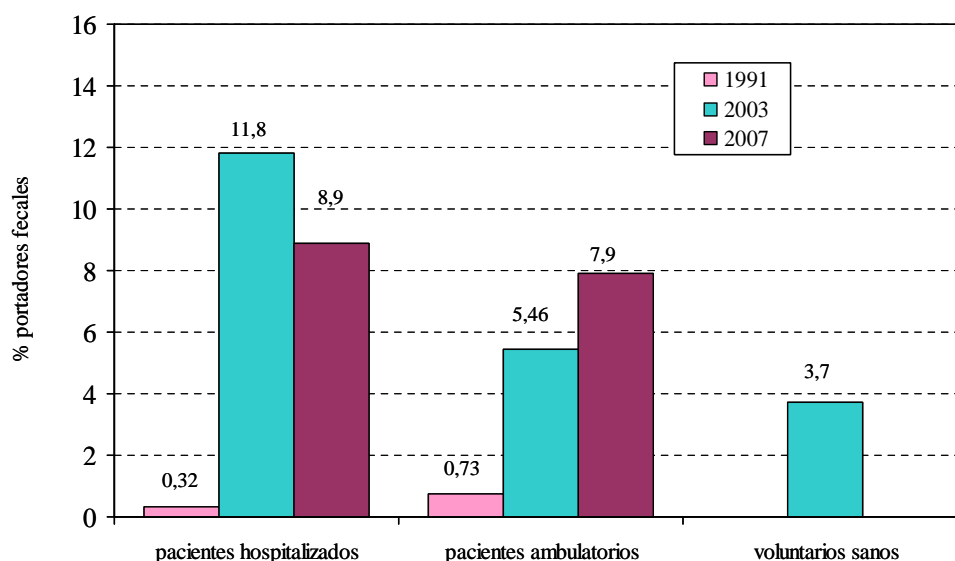
## 1. ESTUDIOS ECOLÓGICOS Y DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE BLEE

En este apartado se analizan los resultados obtenidos en los estudios de colonización por enterobacterias productoras de BLEE en pacientes hospitalizados y ambulatorios, voluntarios sanos y convivientes de pacientes con infecciones causadas por estos microorganismos. También se analiza la presencia de microorganismos productores de BLEE en muestras de aguas y alimentos.

### 1.1 Epidemiología de enterobacterias productoras de BLEE en portadores fecales de distintos compartimentos

#### 1.1.1 Prevalencia de portadores fecales

El porcentaje de portadores fecales de enterobacterias productoras de BLEE en pacientes atendidos en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, aumentó desde 0,6% (5/849 pacientes) en el año 1991 a 7,0% (27/386 pacientes) en 2003 ( $p<0,001$ ). En el año 2007 se observó un incremento no significativo de esta cifra con respecto al año 2003, alcanzando un 8,2% (38/462 pacientes). Cuando se analizan por separado los pacientes hospitalizados y ambulatorios, el porcentaje de portadores fecales de enterobacterias con BLEE en pacientes hospitalizados fue del 0,3% (1/305) en 1991, del 11,8% (11/93) en 2003 y del 8,9% (13/146) en 2007. En pacientes no hospitalizados, los porcentajes obtenidos fueron: 0,7% (4/544) en 1991, 5,5% (16/293) en 2003 y 7,9% (25/316) en 2007 (Figura 14). Las características de los aislados obtenidos se muestran en la tabla 12.



**Figura 14.** Prevalencia de portadores fecales de enterobacterias productoras de BLEE en 1991, 2003 y 2007.

**Tabla 12.** Características de los aislados productores de BLEE obtenidos de muestras fecales de pacientes en los años 1991, 2003 y 2007

Año	BLEE	Especie	Pulsotipo	Área	Punto isoelectrico	Resistencias asociadas <sup>c</sup>
1991	TEM-4	<i>E. coli</i>	EC6T	Neumología	5,9	~
		<i>E. coli</i>	DEG	Extrahospitalario <sup>a</sup>	5,9 + 5,4	Sm, Sp, Gm, Tb, Ne, Nm, Na, Cp, Su, Tp, Te
		<i>E. coli</i>	DEG	Extrahospitalario	5,9 + 5,4	Sm, Gm, Tb, Na, Cp, Su, Te
CTX-M-10		<i>E. coli</i>	EC7C	Extrahospitalario	8,1	~
		<i>K. pneumoniae</i>	Kp30C	Extrahospitalario	8,1	~
		<i>C. freundii</i>	CF1C	Extrahospitalario	8,1	~
2003	TEM-4	<i>E. coli</i>	ECF231T	Gastroenterología	5,9	~
		<i>E. coli</i>	ECF355T	Gastroenterología	5,9	Sm
		<i>E. coli</i>	ECF295T	Gastroenterología	5,9 + 5,4	Sm, Na, Su, Tp, Te, Cl
SHV-2	SHV-12	<i>E. coli</i>	ECF394S	Pediatría	7,6 + 5,4	Te, Su, Tp, Cl
		<i>E. coli</i>	ECF284S	Enf. Infecciosas	8,2	Te, Su, Cl
		<i>E. coli</i>	ECF335S	Gastroenterología	8,2	Su, Cl
		<i>E. coli</i>	ECF222S	Extrahospitalario	8,2	~
		<i>E. coli</i>	ECF250S	Extrahospitalario	8,2	Na, Su, Cl
		<i>E. coli</i>	ECF250S	Extrahospitalario	8,2	Na, Su, Cl
		<i>E. coli</i>	ECF310S	Extrahospitalario	8,2 + 5,4	Na, Cp, Su, Te, Cl
		<i>E. coli</i>	DEG	Extrahospitalario	8,2 + 5,4	Sm, Na, Cp, Su, Tp, Te
CTX-M-10		<i>E. coli</i>	ECF147C	Extrahospitalario	8,1 + 5,4	Sm, Sp, Na, Su, Tp
		<i>E. coli</i>	ECF284C	Enf. Infecciosas	8,1	Na
		<i>E. coli</i>	DEG	Cardiología	8,1 + 5,4	Sm, Su, Te
CTX-M-9		<i>E. coli</i>	ECF5C	Extrahospitalario	8,1	Sm, Sp, Su, Tp, Te
		<i>E. coli</i>	ECF87C	Extrahospitalario	8,1	Sm, Sp, Na, Cp, Su, Tp, Te
		<i>E. coli</i>	ECF311C	Extrahospitalario	8,1 + 5,4	Sm, Sp, Su, Tp, Te
CTX-M-14		<i>E. coli</i>	ECF386C	Extrahospitalario	8,1 + 5,4	Sm, Sp, Na, Cp, Su, Tp, Te
		<i>E. coli</i>	ECF325C	Enf. Infecciosas	8,1 + 5,4	Sm, Na, Su, Tp, Te
		<i>E. coli</i>	ECF327C	Enf. Infecciosas	8,1 + 5,4	Sm, Na, Cp, Su, Tp, Te, Cl
		<i>E. coli</i>	ECF397C	Nefrología	8,1	Na

Tabla 12. Continuación

Año	BLEE	Especie	Pulsotipo	Área	Punto isoelectrónico	Resistencias asociadas <sup>c</sup>
2003		<i>E. coli</i>	DEG	Extrahospitalario	8,1	Na, Te, Su
		<i>E. coli</i>	ECF216C	Extrahospitalario	8,1	Sm, Sp, Nm, Km, Na, Cp, Su, Tp, Te
		<i>E. coli</i>	ECF245C	Extrahospitalario	8,1	Sm, Te
		<i>E. coli</i>	ECF245C	Extrahospitalario	8,1	Sm, Te
		<i>E. coli</i>	ECF336C	Extrahospitalario	8,1 + 5,4	Na, Cp, Te, Su, Tp, Cl
		<i>E. coli</i>	ECF383C	Extrahospitalario	8,1 + 5,4	Sm, Nm, Su, Tp
NC		<i>E. coli</i>	ECF38	Hematología	7,6	Sm, Sp, Su, Tp, Te, Cl
		<i>E. coli</i>	EC35T	Hematología	ND <sup>b</sup>	Sm, Km, Su, Tp
2007	TEM-19	<i>E. coli</i>	EC35T	Hematología	ND <sup>b</sup>	Sm, Km, Su, Tp
		<i>E. coli</i>	EC4T	Extrahospitalario	ND	Sm, Km, Ak, Ap, Na, Su, Te
SHV-2		<i>K. pneumoniae</i>	Kp22S	Extrahospitalario	ND	Sm, Sp, Gm, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Ne, Na, Cp, Su, Te, Cl
		<i>E. coli</i>	DEG	Medicina interna	ND	Sm, Km, Tb, Ak, Ap, Na, Cp, Te
SHV-12		<i>K. pneumoniae</i>	Kp21S	Nefrología	ND	Sm, Sp, Gm, Km, Tb, Ak, Na, Cp, Su, Tp
		<i>E. coli</i>	EC18S	Nefrología	ND	Sm, Sp, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Su, Te
		<i>E. coli</i>	EC16S	Extrahospitalario	ND	Sm, Sp, Gm, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Na, Cp, Su, Te, Cl
		<i>E. coli</i>	EC15S	Extrahospitalario	ND	Sm, Sp, Gm, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Na, Cp, Su, Te
		<i>E. coli</i>	EC17S	Extrahospitalario	ND	Sm, Sp, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Na, Cl, Su, Te
		<i>E. coli</i>	EC37S	Extrahospitalario	ND	Sm, Sp, Km, Tb, Ap, Na, Cp, Su, Te, Cl
		<i>E. coli</i>	EC24S	Extrahospitalario	ND	Sm, Sp, Km, Ap, Na, Cl, Su
		<i>E. coli</i>	EC27S	Extrahospitalario	ND	Sm, Km, Ak, Ap, Nm, Na, Cp, Su, Te
		<i>E. coli</i>	EC33S	Extrahospitalario	ND	Sm, Km, Ak, Ap, Na, Cp
		<i>E. coli</i>	EC41S	Extrahospitalario	ND	Sm, Km, Ap, Cl, Su
CTX-M-1		<i>E. coli</i>	DEG	Extrahospitalario	ND	Sm, Km, Ap, Na, Cp, Te
		<i>E. coli</i>	EC25C	Extrahospitalario	ND	Sm, Km, Ap, Su, Te
		<i>K. pneumoniae</i>	Kp20C	Cardiología	ND	Sm, Sp, Gm, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Ne, Su, Te
		<i>E. coli</i>	EC1C	Cardiología	ND	Sm, Sp, Gm, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Ne, Su, Te
		<i>E. coli</i>	EC28C	Traumatología	ND	Sm, Sp, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Ne, Na, Cp, Su, Tp, Te
		<i>E. coli</i>	EC30C	Gastroenterología	ND	Sm, Sp, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Ne, Na, Cp, Su, Tp, Te
		<i>E. coli</i>	EC3C	Gastroenterología	ND	Sm, Gm, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Ne, Na, Cp, Su, Tp, Te
		<i>E. coli</i>	EC3C	Gastroenterología	ND	Sm, Gm, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Ne, Na, Cp, Su, Tp, Te
		<i>E. coli</i>	EC3C	Gastroenterología	ND	Sm, Gm, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Ne, Na, Cp, Su, Tp, Te
		<i>E. coli</i>	EC3C	Gastroenterología	ND	Sm, Gm, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Ne, Na, Cp, Su, Tp, Te



Tabla 12. Continuación

Año BLEE	Especie	Pulsotipo	Área	Punto isoelectrico	Resistencias asociadas <sup>c</sup>
2007	CTX-M-15	EC23C	Extrahospitalario	ND	Sm, Gm, Km, Ap, Na, Cp, Su, Tp, Te
	<i>E. coli</i>	EC19C	Extrahospitalario	ND	Sm, Km, Nm, Na, Su, Te
	<i>E. coli</i>	DEG	Medicina Interna	ND	Sm, Km, Tb, Ak, Ap, Na, Cp, Te
CTX-M-32	<i>E. coli</i>	EC2C	Extrahospitalario	ND	Sm, Sp, Gm, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Na, Cp, Su, Te, Cl
	<i>E. coli</i>	DEG	Extrahospitalario	ND	Sm, Sp, Km, Na, Su, Te
	<i>E. coli</i>	DEG	Extrahospitalario	ND	Sm, Gm, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Na, Cp, Su, Te
CTX-M-9	<i>E. coli</i>	EC34C	Hematología	ND	Sm, Sp, Km, Ap, Na, Cp, Su, Tp, Te
	<i>E. coli</i>	EC10C	Oncología	ND	Sm, Sp, Gm, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Na, Cp, Su, Tp, Te
	<i>E. coli</i>	EC29C	Extrahospitalario	ND	Sm, Sp, Gm, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Na, Cp, Su, Te
CTX-M-14	<i>E. coli</i>	EC5C	Extrahospitalario	ND	Sm, Sp, Gm, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Na, Cp, Su, Te, Cl
	<i>E. coli</i>	EC7C	Extrahospitalario	ND	Sm, Sp, Gm, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Na, Cp, Su, Te
	<i>E. coli</i>	EC6C	Extrahospitalario	ND	Sm, Sp, Gm, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Na, Cp, Su, Te
	<i>E. coli</i>	EC8C	Extrahospitalario	ND	Sm, Sp, Gm, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Na, Su, Te
	<i>E. coli</i>	EC14C	Extrahospitalario	ND	Sm, Sp, Gm, Km, Tb, Ne, Ak, Ap, Nm, Na, Cp, Su, Tp, Te
	<i>E. coli</i>	EC12C	Extrahospitalario	ND	Sm, Sp, Gm, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Su
	<i>E. coli</i>	EC9C	Extrahospitalario	ND	Sm, Sp, Gm, Km, Ap, Nm, Na, Cp, Su, Te
	<i>E. coli</i>	EC32C	Extrahospitalario	ND	Sm, Km, Tb, Ak, Ap, Nm, Su
	<i>E. coli</i>	EC36C	Extrahospitalario	ND	Sm, Km, Tb, Ap, Na, Cp, Su, Tp, Te
	<i>E. coli</i>	EC31C	Extrahospitalario	ND	Sm, Km, Tb, Ak, Su, Tp
	<i>E. coli</i>	EC40C	Extrahospitalario	ND	Km
	<i>E. coli</i>	EC28C	Traumatología	ND	Sm, Sp, Km, Tb, Ne, Ak, Ap, Nm, Na, Cp, Su, Tp, Te
	<i>E. coli</i>	EC39C	Traumatología	ND	Sm, Km, Tb, Ap, Te
	<i>E. coli</i>	EC26C	Medicina Interna	ND	Sm, Km, Tb, Ak, Ap, Na, Cp, Su, Tp, Te, Cl
	<i>E. coli</i>	EC38C	Nefrología	ND	Sm, Km, Tb, Ap, Na, Cp

NC: no caracterizado, DEG: ADN degradado; a. Los pacientes extrahospitalarios incluyen aquellos procedentes de urgencias y de atención primaria b. ND: no determinado, la identificación de las BLEE se hizo a nivel genético aunque la presencia de otras BLEE no puede ser descartada. c. Los aislados con sensibilidad intermedia se consideran resistentes. (~) aislados sensibles a todos los antibióticos estudiados. Ak: amicacina; Ap: apramicina; Cl: cloranfenicol; Cp: ciprofloxacino; Gm: gentamicina; Km: kanamicina; Na: ácido nalidíxico; Ne: netilmicina; Nm: neomicina; Sm: estreptomina; Sp: espectinomina; Su: sulfonamidas; Tb: tobramicina; Tp: trimetoprim; Te: tetraciclina.

Los pacientes hospitalizados en los años 1991, 2003 y 2007 procedían mayoritariamente de unidades médicas (100,0%; 1 /1, 100,0%; 12/12 y 78,6% 11/14), respectivamente), mientras que en el año 2007, también se identificaron pacientes de otras áreas como cirugía (14,3%; 2/14) y unidades de cuidados intensivos (7,1%; 1/14).

El porcentaje de portadores fecales entre los voluntarios sanos de la comunidad que participaron en el estudio en 2003 (3,7%; 4/108), es ligeramente inferior al obtenido para los pacientes ambulatorios (5,5%; 16/293) de ese mismo año (Figura 14). En todos los casos el microorganismo caracterizado fue *E. coli*. Las características de los aislados de los voluntarios sanos se muestran en la tabla 13.

**Tabla 13.** Características de los aislados productores de BLEE obtenidos de muestras fecales de voluntarios sanos en 2003.

Año	Pulsotipo	BLEE	Punto isoeléctrico	Resistencias asociadas <sup>a</sup>
2003	ECVS27C	CTX-M-2	8,1	Na, Cp, Te, Su
	ECVS62C	CTX-M-14	8,1	Sm, Te, Su, Tp
	ECVS41S	SHV-12	8,2	~
	ECVS85S	SHV-12	8,2	Te, Su

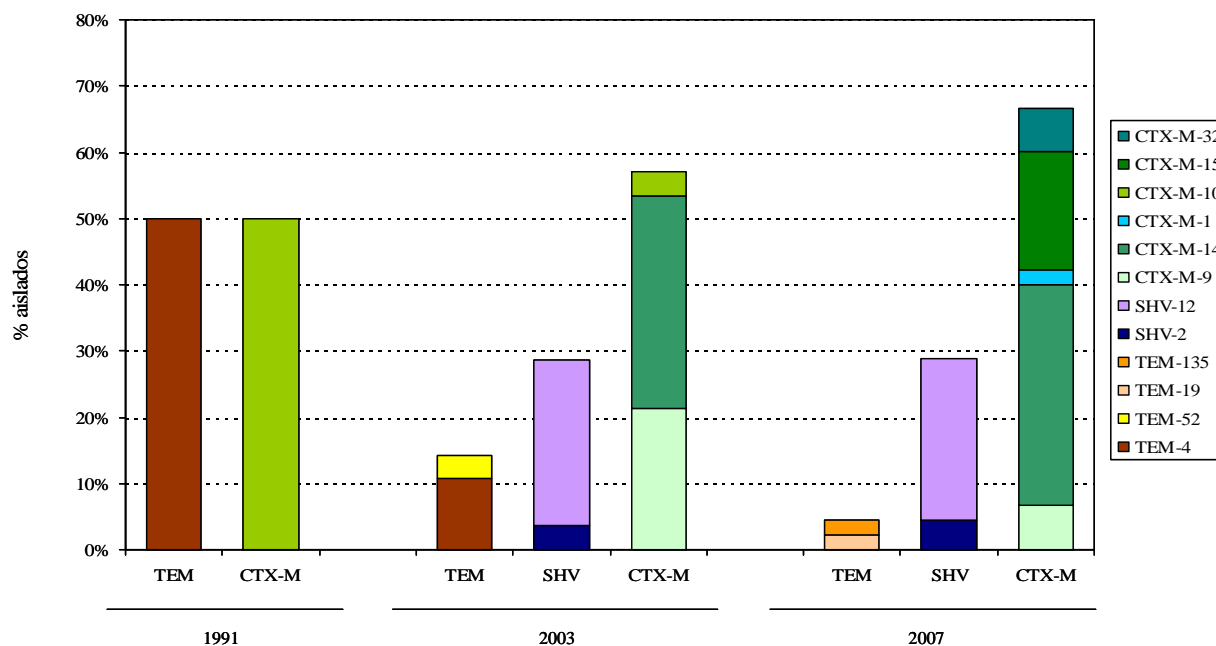
a. Los aislados sensibles a todos los antibióticos estudiados se representan con (~). Los aislados con sensibilidad intermedia se consideran resistentes.

Cp: ciprofloxacino; Na: ácido nalidíxico; Sm: estreptomicina; Su: sulfonamidas; Te: tetraciclina; Tp: trimetoprim.

### 1.1.2 Caracterización de BLEE

El análisis de los resultados obtenidos en las tres etapas estudiadas permitió observar un aumento tanto en el número de aislados como en el número y tipo de BLEE descritas (Tabla 12, Figura 15). En el año 1991, las 6 BLEE identificadas correspondieron a los grupos TEM (3 TEM-4) y CTX-M (3 CTX-M-10). Las 32 enzimas encontradas en 2003 fueron TEM (10,7%; 2 TEM-4, 1 TEM-52), SHV (28,6%; 1 SHV-2, 7 SHV-12) y CTX-M (57,1%; 1 CTX-M-10, 6 CTX-M-9, 9 CTX-M-14) y una BLEE de pI=7,6 no caracterizada (3,6%). Finalmente, en 2007 se describieron 45 enzimas observándose un descenso en las de tipo TEM (4,4%; 1 TEM-19, 1 TEM-135), el mantenimiento de las de tipo SHV (28,9%; 2 SHV-2, 11 SHV-12) y el aumento de las de tipo CTX-M (66,7%; 1 CTX-M-1, 8 CTX-M-15, 3

CTX-M-32, 3 CTX-M-9, 15 CTX-M-14). Cabe destacar la descripción mayoritaria de CTX-M-14 tanto en 2003 como en 2007 (56,2% y 50,0%; respectivamente) y de SHV-12 (21,9% y 24,4%). En 2007 se produjo la aparición de las enzimas del grupo CTX-M-1 (40,0%).



**Figura 15.** Distribución de los distintos tipos de BLEE obtenidos de muestras fecales de pacientes y de voluntarios sanos en los años 1991, 2003 y 2007.

Si se analizan por separado las enzimas identificadas en pacientes hospitalizados y ambulatorios, en pacientes hospitalizados en el año 1991 sólo se identificó TEM-4. En 2003, el 50,0% de las enzimas identificadas fueron de tipo TEM (TEM-4, 52) y SHV (SHV-2, 12). En cambio, CTX-M-15 fue la principal enzima (37,5%) asociada mayoritariamente con aislados nosocomiales en el año 2007.

Los principales responsables de la colonización de pacientes ambulatorios en el año 1991 fueron microorganismos productores de TEM-4 (40,0%) y de CTX-M-10 (60,0%). En el año 2003 se identificaron enzimas del grupo CTX-M-9 (62,5%) y SHV-12 (31,2%). Esta tendencia se mantuvo en 2007, donde las principales enzimas encontradas en pacientes ambulatorios fueron CTX-M-14 (38,0%) y SHV-12 (31,0%).

La caracterización de las BLEE obtenidas de los 4 aislados de heces de voluntarios sanos fueron dos SHV-12, una CTX-M-14 y otra CTX-M-2 (la primera de este tipo descrita en nuestro país) (Tabla 13).

### 1.1.3 Estructura poblacional

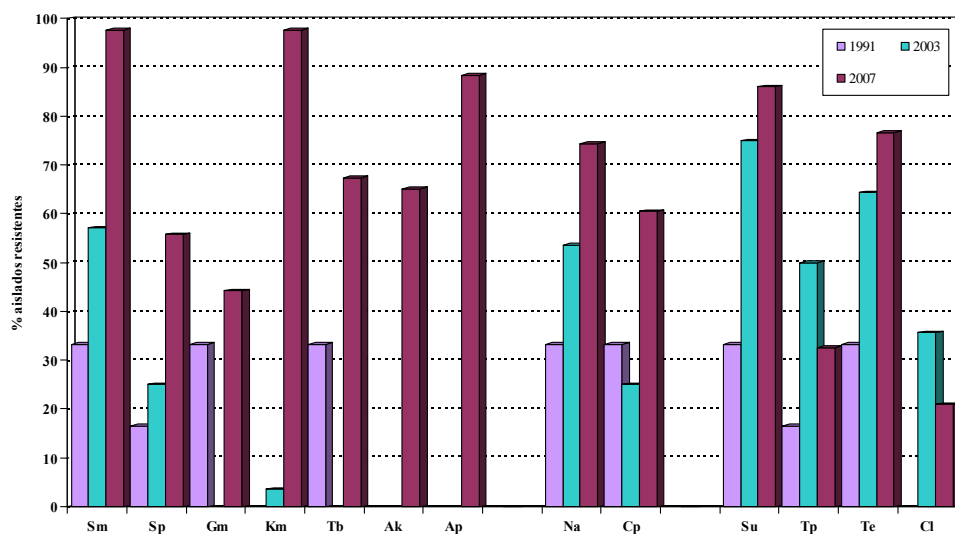
Los aislados de enterobacterias obtenidos en 1991 (n=6) correspondieron a *E. coli* (n=4), *K. pneumoniae* (n=1) y *Citrobacter freundii* (n=1). En cambio, en el año 2003 todos los aislados tanto de muestras de pacientes (n=32) como de voluntarios sanos (n=4) fueron identificados como *E. coli*. En 2007 (n=43), se obtuvieron 40 aislados de *E. coli* y 3 de *K. pneumoniae* (Tabla 12).

El análisis de la estructura poblacional mediante PFGE de los distintos aislados obtenidos de los portadores fecales de 1991, 2003 y 2007 y de los voluntarios sanos, mostró una gran diversidad de patrones, demostrando la ausencia de clones epidémicos en la población estudiada. A pesar de ello, se produjeron distintas situaciones puntuales a lo largo del estudio donde se identificaron clones productores de distintas o de una misma BLEE colonizando simultáneamente a un mismo paciente. También se produjo la colonización de un mismo individuo por un clon productor de diferentes BLEE y la presencia de un mismo clon productor de la misma BLEE en distintos pacientes (Tabla 12).

### 1.1.4 Sensibilidad a antibióticos no beta-lactámicos

Los perfiles de resistencia obtenidos para los aislados de los años 1991, 2003 y 2007 se muestran en la tabla 12 y en la figura 16. El análisis de los valores obtenidos mostró, en general, un aumento de la resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Comparando los valores de resistencia obtenidos para distintos antibióticos en aislados productores de BLEE, en los años 2003 y 2007, se observa un aumento significativo de la resistencia a estreptomina (57,1 vs 97,7%;  $p=0,01$ ), espectinomicina (25,0 vs 55,8%;  $p<0,0001$ ), y ciprofloxacino (25,0 vs 60,5%;  $p=0,003$ ). También se ha observado un aumento en la resistencia a ácido nalidíxico (53,6 vs 74,4%), sulfonamidas (80,8 vs 86,1%) y tetraciclinas (69,2 vs 76,7%). Cabe resaltar el gran número de aislados resistentes a aminoglucósidos aparecidos en 2007 (gentamicina; 44,2%, tobramicina; 67,4%, amicacina; 65,1% y apramicina; 88,4%), siendo significativo el aumento a kanamicina (3,6% vs 97,7%;  $p<0,001$ ), debido principalmente a aislados de la comunidad, especialmente a los productores de CTX-

M-14 y SHV-12. Con posterioridad se analizó el posible mecanismo asociado a esta resistencia en estos aislados.

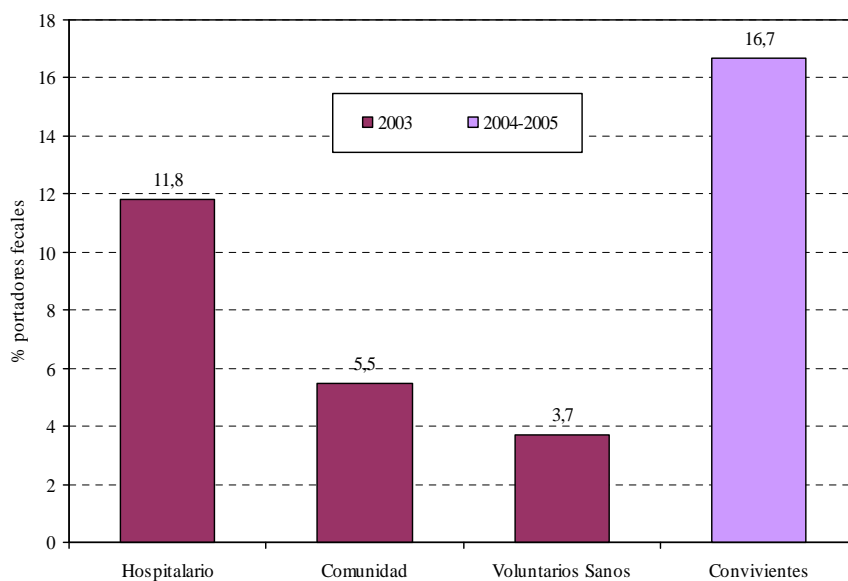


**Figura 16.** Comparación de los aislados resistentes a diferentes antimicrobianos de los años 1991, 2003 y 2007. Ak: amicacina; Ap: apramicina; Cl: cloranfenicol; Cp: ciprofloxacino; Gm: gentamicina; Km: kanamicina; Na: ácido nalidíxico; Sm: estreptomycin; Sp: espectinomycin; Su: sulfonamidas; Tb: tobramicina; Te: tetraciclina; Tp: trimetoprim.

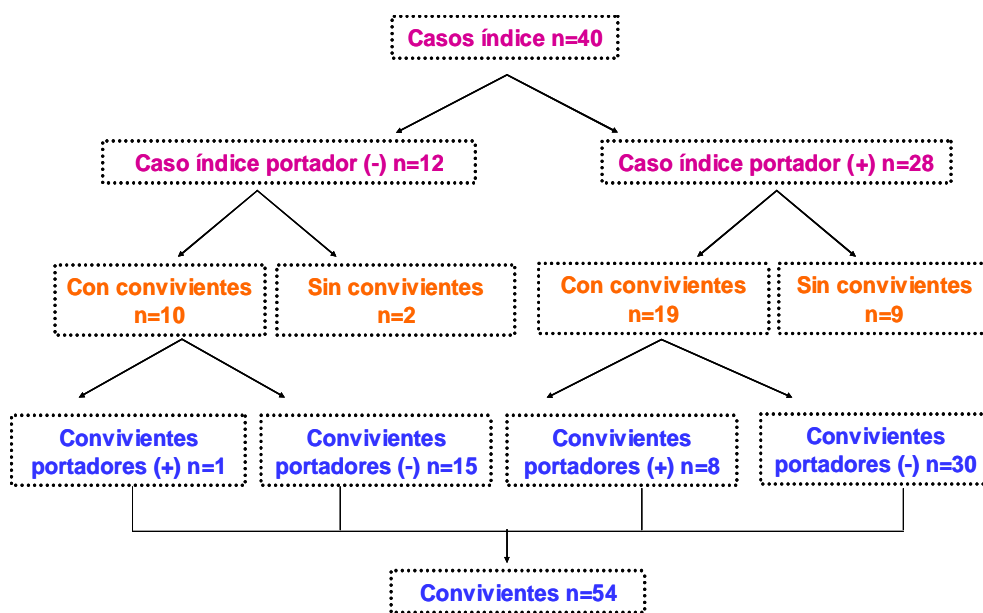
## 1.2. Epidemiología de enterobacterias productoras de BLEE en convivientes de pacientes con infección por estos microorganismos

### 1.2.1 Prevalencia de portadores fecales

La prevalencia de portadores fecales de *E. coli* productor de BLEE fue de un 70,0% (28/40) entre los casos índice y de un 16,7% (9/54) en el caso de los convivientes. El porcentaje de convivientes colonizados fue significativamente más elevado que el obtenido en el 2003 en el grupo de pacientes extrahospitalarios ( $p=0,003$ ; 5,5%; 16/293) y en el de voluntarios sanos ( $p=0,003$ ; 3,7%; 4/108) (Figura 17). Nueve de los casos índice presentaron al menos un conviviente colonizado (31,0%; 9/29). Este porcentaje fue mayor que el de los casos índice sin colonización intestinal con convivientes portadores (10,0%; 1/10) y aumentó significativamente (42,1%; 8/19;  $p=0,024$ ) en el grupo de casos índice portadores fecales con convivientes colonizados (Figura 18).



**Figura 17.** Porcentaje de portadores fecales en distintos compartimentos.



**Caso índice:** Paciente con infección por organismo productor de BLEE

**Caso índice portador (+)** : Paciente con infección por microorganismos productores de BLEE y cultivo fecal positivo para BLEE

**Caso índice portador (-)** : Paciente con infección por microorganismos productores de BLEE y cultivo fecal negativo para BLEE

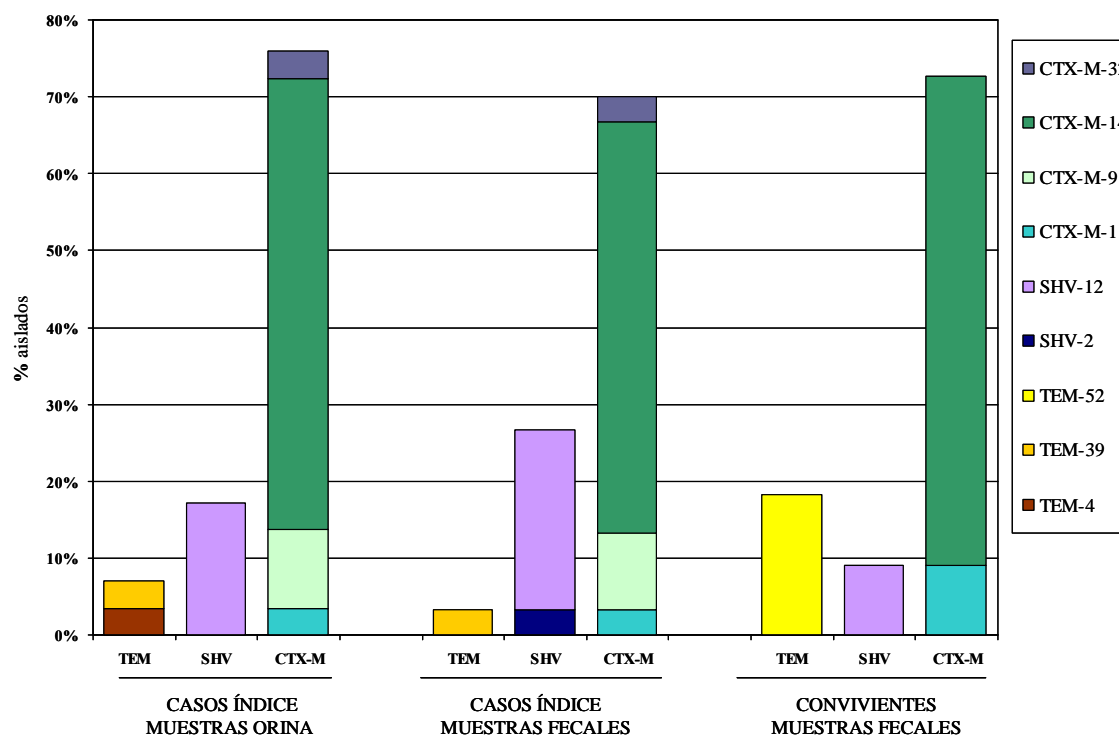
**Convivientes portadores (+)** : Convivientes con muestra fecales positivas para microorganismos productores de BLEE

**Convivientes portadores (-)** : Convivientes con muestra fecales negativas para microorganismos productores de BLEE

**Figura 18.** Casos índice portadores de enterobacterias productoras de BLEE y sus correspondientes convivientes.

### 1.2.2 Caracterización de BLEE

La caracterización de estas enzimas reveló una alta frecuencia de variantes de tipo CTX-M (71,4%) y de SHV (20,0%) en relación con las de tipo TEM (7,1%) tanto en los casos índice como en los convivientes. La alta representación de enzimas de tipo CTX-M se debe a la presencia mayoritaria de CTX-M-14 (78,4%) y a CTX-M-9 (11,8%) y a las del grupo de CTX-M-1 (7,1%). Dentro de las de tipo SHV se describe mayoritariamente la variante SHV-12 (92,8%) (Figura 19 y Tablas 14, 15).



**Figura 19.** Distribución de BLEE de muestras clínicas y fecales de los casos índice y los convivientes.

En diferentes casos, en un mismo individuo se describieron distintos tipos de enzimas (CI6 y CI7, GF3 y GF6) al igual que entre un caso índice y su correspondiente conviviente (GF8) (Tablas 14 y 15).

**Tabla 14.** Características de los aislados productores de BLEE de los casos índice sin convivientes

Caso índice	BLEE	Filogrupo	Pulsotipo (n° aislados)	Especie (n° aislados)	Muestra (n° aislados)
CI6	TEM-4	NC	CV18S (1)	<i>K. pneumoniae</i> (1)	Orina (1)
	SHV-12	B1	DEG (1)	<i>E. coli</i> (1)	Heces (1)
CI14	TEM-39	A	CV41T (2)	<i>E. coli</i> (2)	Orina (1), Heces (1)
CI8	SHV-12	A	CV24S (2)	<i>E. coli</i> (2)	Orina (1), Heces (1)
CI3		B1	CV14S (1) DEG (1)	<i>E. coli</i> (2)	Orina (1) Heces (1)
CI5			CV17S (2)	<i>E. coli</i> (2)	Orina (1), Heces (1)
CI9	CTX-M-32	D	CV28C (2)	<i>E. coli</i> (2)	Orina (1), Heces (1)
CI20	CTX-M-9	A, D	CV86C (2)	<i>E. coli</i> (2)	Orina (1), Heces (1)
CI10		B1	CV29C (2)	<i>E. coli</i> (2)	Orina (1), Heces (1)
CI17		D	CV70C (2)	<i>E. coli</i> (2)	Orina (1), Heces (1)
CI1	CTX-M-14	A	CV3C (1) CV3HC (1)	<i>E. coli</i> (2)	Orina (1) Heces (1)
CI4			CV16C (2)	<i>E. coli</i> (2)	Orina (1), Heces (1)
CI13			CV40C (2)	<i>E. coli</i> (2)	Orina (1), Heces (1)
CI15			CV52C (2)	<i>E. coli</i> (2)	Orina (1), Heces (1)
II6		B1	CV59C (2)	<i>E. coli</i> (2)	Orina (1), Heces (1)
CI18			CV77C (2)	<i>E. coli</i> (2)	Orina (1), Heces (1)
CI19			CV80C (1) CV80HC (1)	<i>E. coli</i> (2)	Orina (1) Heces (1)
CI2		D	CV12C (2)	<i>E. coli</i> (2)	Orina (1), Heces (1)
CI11			CV37C (1) CV37HC (1)	<i>E. coli</i> (2)	Orina (1) Heces (1)
CI7	CTX-M-14 SHV-2	D	CV20C (1) CV20S (1)	<i>E. coli</i> (2)	Orina (1) Heces (1)
CI12	CTX-M-14 SHV-12	D A	CV39C (2) CV39S (1)	<i>E. coli</i> (3)	Orina (1), Heces (1) Heces (1)

NC: no caracterizado; DEG: ADN degradado.



**Tabla 15.** Características de los aislados de *E. coli* productores de BLEE de los casos índice y sus correspondientes convivientes.

Grupo familiar (n° convivientes)	Caso índice				Conviviente <sup>a</sup>		
	BLEE	Filogrupo	Pulsotipo	Muestra	BLEE	Filogrupo	Pulsotipo
GF9 (1)	SHV-12	D	CV94S	Orina	SHV-12	D	CV94S
	SHV-12	D	CV94S	Heces			
GF3 (1)	SHV-12	D	CV44S	Orina	CTX-M-14	A	CV44C
	SHV-12	D	CV44S	Heces			
	CTX-M-14	A	CV44C	Heces			
GF7 (1)	CTX-M-14	A	CV81C	Orina	CTX-M-14	D	CV82C
	CTX-M-14	A	CV81C	Heces			
GF2 (1)	CTX-M-14	A	CV34C	Orina	CTX-M-14	A	CV36C
	NEG	ND	DEG	Heces			
GF5 (1)	CTX-M-14	A	CV64C	Orina	CTX-M-14	B1	CV64C
	CTX-M-14	B1	CV64C	Heces			
GF8 (1)	CTX-M-14	B1	CV92C	Orina	TEM-52	A	CV93.1T
	CTX-M-14	A	CV92HC	Heces			
GF1 (1)	CTX-M-14	D	CV5C	Orina	CTX-M-14	D	CV5C
	CTX-M-14	D	CV5C	Heces			
GF4 (1)	CTX-M-14	B1	CV61C	Orina	CTX-M-14	B1	CV61C
	CTX-M-14	B1	CV61C	Heces			
GF6 (1)	CTX-M-1	D	CV68C	Orina	CTX-M-1	D	CV68C
	CTX-M-1	D	CV68C	Heces			
					CTX-M-14	D	CV69C

GF: grupo familiar; NEG: muestra negativa de BLEE en heces; ND: no determinado; DEG: ADN degradado.

a. Los aislados de los convivientes se obtuvieron de muestras fecales.

### 1.2.3 Estructura poblacional

Los aislados de *E. coli* (n= 69) fueron clasificados en los grupos filogenéticos D (37,7%; 26/69), A (34,8%; 24/69), y B1 (27,5%; 19/69) (Tablas 14 y 15).

Los aislados clínicos y fecales de *E. coli* de los casos índice presentaron el mismo perfil de PFGE en 21 de 29 casos (72,0%). El análisis de los pulsotipos de los aislados de *E. coli* productores de BLEE de los casos índice (de muestras clínicas o fecales) y su correspondiente conviviente reveló un patrón indistinguible en 6 de 9 casos (66,0%) (Tablas 14 y 15).

### 1.2.4 Sensibilidad a antibióticos no beta-lactámicos

Los perfiles de sensibilidad obtenidos muestran altas tasas de resistencia a quinolonas (ciprofloxacino, 50,7%; ácido nalidíxico, 79,1%), aminoglucósidos (estreptomycin, 79,1%; gentamicina, 17,8%; kanamicina, 32,8%; tobramicina, 26,9% y apramicina 19,4%), sulfonamidas (65,6%); trimetoprim (61,2%) y tetraciclinas (77,6%) (Tabla 16).

**Tabla 16.** Resistencias a antibióticos no beta-lactámicos de los aislados productores de BLEE de los casos índice y los convivientes.

BLEE	Pulsotipo (n° aislados)	Resistencias asociadas <sup>a</sup>
TEM-39	CV41T (2)	Sm, Sp, Gm, Km, Tb, Nm, Ne, Na, Cp, Su, Tp, Te, Cl
TEM-52	CV93.1T (1)	Gm, Km, Tb, Na, Cp, Te
	CV93.2T (1)	Na
SHV-2	CV20S (1)	Sm, Na, Te
SHV-11	CV18S	Sm, Sp
SHV-12	CV14S	Sm, Sp, Ap, Na, Cp, Su, Tp, Te, Cl
	DEG	Sm, Sp, Na, Cp, Su, Tp, Te, Cl
	CV17S (2)	Sm, Sp, Su, Tp, Te, Cl
	DEG	Sm, Sp, Su, Tp, Te, Cl
	CV24S (2)	Sm, Na, Cp, Su, Tp, Te
	CV39S (1)	Sm, Sp, Na, Su, Te, Cl
	CV44S (2)	Sm, Gm, Tb, Na, Cp, Su, Tp, Te
	CV94S (3)	Na, Cp, Te, Cl
CTX-M-1	CV68C (3)	(Sp, Ap), Na, Te
CTX-M-32	CV28C (2)	~
	CV69C (1)	Na
	CV3HC (1)	Sm, Km, Tb, Ap, Nm, Na, Su, Tp, Te, Cl
	CV3C (1)	Km, Nm, Te
	CV5C (3)	Sm, Km, Nm, Na, Su, Te, Cl
	CV12C (2)	Sm, Sp, Na, Cp, Su, Tp, Te, Cl
CTX-M-9	CV29C (2)	Sm, Sp, Ap, Na, Cp, Su, Tp
	CV70C (2)	Sm, Sp, Gm, Km, Tb, Na, Cp, Su, Tp, Te, Cl
	CV86C (2)	Sm, Sp, Km, Nm, Na, Cp, Su, Tp, Te, Cl
CTX-M-14	CV16C (2)	Gm, Km, Tb, (Nm), Na, Cp, Su, Tp, Te
	CV20C (1)	Sm, Na
	CV34C (1)	Sm, Na, Cp, Su, Tp, Te, Cl
	CV36C (1)	Su, Cl
	CV37HC (1)	Sm, Na, Cp, Su, Tp, Te, Cl
	CV37C (1)	Sm, Sp, Su, Tp, Te
	CV39C (2)	Sm, Sp, Na, Su, Tp, (Te), Cl
	CV40C (2)	Sm, (Sp), Su, Te
	CV44C (2)	Sm, Sp, Na, Cp, Su, Tp
	CV52C (2)	Sm, Na, Su, Tp
	CV59C (2)	Na, Cp
	CV61C (3)	(Km, Tb), Ap, Na, Cp
	CV64C (3)	Sm, Km, Tb, Ap, Na, Cp, Su, Tp, Te, Cl
	CV77HC (1)	Sm, Gm, Km, Ap, Nm, Na, Su, Tp, Te
	CV77C (1)	~
	CV80O (1)	Sm, Sp, Gm, Km, Tb, Ak, Nm, Su, Tp, Cl
	CV80C (1)	Sm, Su, Km, Nm, Tp, Te
	CV81C (2)	Sm, Na, Tp, Te
	CV82C (1)	Sm
	CV92C (1)	Sm, Gm, Tb, Ap, Su, Tp, Te, Cl
	CV92HC (1)	Tp, Te

DEG: ADN degradado. **a.** Los aislados con sensibilidad intermedia se consideran resistentes. **b.** Las resistencias a los antibióticos entre paréntesis indican sensibilidad variable a ese antibiótico. (~) aislados sensibles a todos los antibióticos estudiados. Ap: apramicina; Cl: cloranfenicol; Cp: ciprofloxacino; Gm: gentamicina; Km: kanamicina; Na: ácido nalidíxico; Ne: netilmicina; Nm: neomicina; Sm: estreptomina; Sp: espectinomicina; Su: sulfonamidas; Tb: tobramicina; Te: tetraciclina; Tp: trimetoprim.

### 1.3 Epidemiología de enterobacterias productoras de BLEE en aguas y alimentos

#### 1.3.1 Prevalencia y caracterización de BLEE

De las 528 **muestras de aguas** analizadas, solamente se obtuvo un resultado positivo en una muestra procedente de un lago, lo que representa un 0,2% de las aguas analizadas y un 4,8% (1/21) de las aguas naturales estudiadas. El microorganismo fue identificado como *E. coli* productor de SHV-12 (Tabla 17).

De las 203 **muestras de alimentos**, se obtuvo un resultado positivo en dos muestras de despiece de pollo, lo que representa un 0,9% de los alimentos analizados y un 9,5% (2/21) dentro de los alimentos no cocinados. Se obtuvieron tres aislados posteriormente identificados como *E. coli* productor de CTX-M-14 y/o SHV-12 (Tabla 17).

#### 1.3.2 Estructura poblacional

Los aislados de *E. coli* se clasificaron en los grupos filogenéticos A (75%; 3/4) y D (25%; 1/4). Los cuatro aislados de *E. coli* presentaron diferentes perfiles de PFGE (Tabla 17).

#### 1.3.3 Sensibilidad a antibióticos no beta-lactámicos

Todos los aislados fueron resistentes a estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclina, el 75% trimetoprim y ácido nalidíxico y el 50% a ciprofloxacino (Tabla 17).

**Tabla 17.** Características de los aislados de *E. coli* productores de BLEE obtenidos de muestras de aguas y alimentos.

BLEE	Muestra	Fecha	Filogrupo	Pulsotipo	Resistencias Asociadas <sup>b</sup>
SHV-12	Agua	2003	A	W71S	Sm, Sp, Na, Su, Tp, Te, Cl
SHV-12	Pollo	2004	D	A33ZS <sup>a</sup>	Sm, Su, Cp, Tp, Te
CTX-M-14	Pollo	2004	A	A33C <sup>a</sup>	Sm, Sp, Na, Cp, Su, Tp, Te
CTX-M-14	Pollo	2004	A	A34C	Sm, Sp, Na, Su, Te, Cl

**a.** Aislados procedentes de la misma muestra. **b.** Los aislados con sensibilidad intermedia se consideran resistentes. Cl: cloranfenicol; Cp: ciprofloxacino; Na: ácido nalidíxico; Sm: estreptomicina; Sp: espectinomicina; Su: sulfonamidas; Te: tetraciclina; Tp: trimetoprim.

## 2. EVOLUCIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUCTOR DE BLEE

A pesar de que en los últimos años la prevalencia de *E. coli* productor de BLEE ha crecido de manera espectacular, *K. pneumoniae* sigue aislándose de manera significativa en los hospitales. Los primeros estudios en los que se describía la existencia de enterobacterias productoras de BLEE eran frecuentemente debidos a brotes epidémicos causados por *K. pneumoniae*. En la actualidad parece constatarse un aumento en su prevalencia en el hospital y en la comunidad. El cambio epidemiológico observado en *E. coli* productor de BLEE en relación al tipo de enzimas y estructura poblacional podría también haberse producido en *K. pneumoniae*. En esta Tesis se incluyeron los aislados de *K. pneumoniae* procedentes de la colección del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal obtenidos entre los años 2001 y 2006 y se compararon con los estudiados previamente entre 1989 y 2000 (Coque y cols., 2002; Valverde y cols., 2008a).

### 2.1 Aislados, pacientes y origen de las muestras

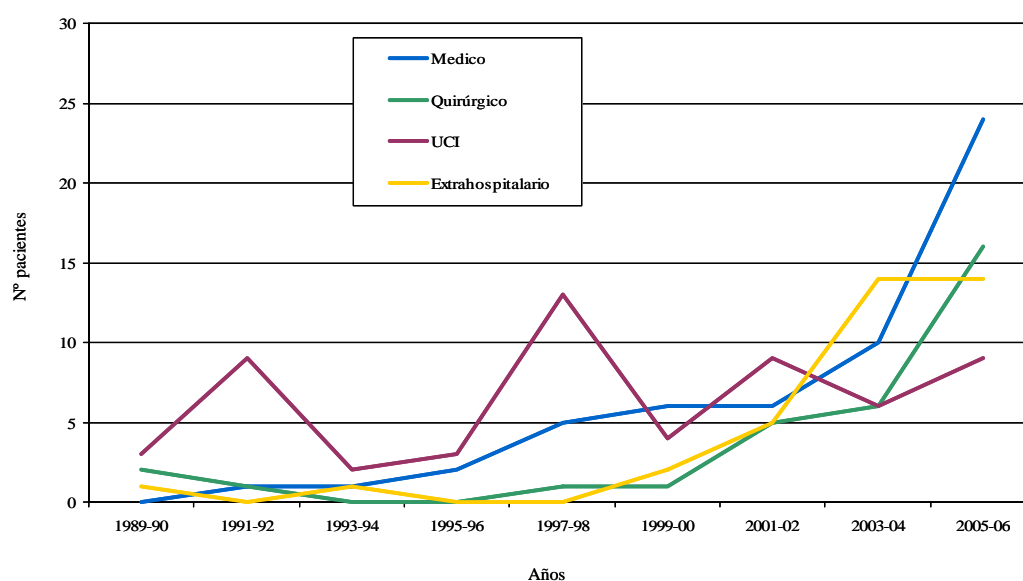
El primer aislado de *K. pneumoniae* productor de BLEE se detectó en nuestro hospital en 1989. Desde entonces se ha producido un aumento en la detección de estos aislados desde el periodo 1989-2000 (n=159; 13,2/año) hasta 2001-2006 (n=180; 30,0/año), siendo este incremento paralelo al del número total de aislados de *K. pneumoniae* identificados en nuestro laboratorio (Tabla 18). Este aumento en la identificación de *K. pneumoniae* ocurrió tras la centralización de los análisis microbiológicos del Área Sanitaria 4 de la Comunidad de Madrid en el Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal, lo que conllevó un aumento considerable del número de muestras procesadas.

El porcentaje de *K. pneumoniae* productor de BLEE varió entre 0,4% y 18,2% (4,8% de media) durante el periodo 1989-2000 y entre 2,5% y 4,7% en el periodo 2001-2006 (3,4% de media). El valor más alto (18,1%) fue registrado en 1998 coincidiendo con un brote en la UCI de cardiopediatría.

Paralelamente, el número de pacientes con aislados de *K. pneumoniae* productores de BLEE por año se incrementó entre los periodos de 1989-2000 (n=58 pacientes; 5,3/año) y 2001-2006 (n=124; 20,6/año) (Tabla 18).

Los pacientes estudiados en 1989-2000 procedieron de diversas UCIs (n=24; 41,0%), Unidades Quirúrgicas (n=21; 36,0%), Unidades Médicas (n=9; 16,0%) y extrahospitalarios

(n=4; 7,0%). En el período 2001-2006 los pacientes pertenecieron a Unidades Médicas (32,3%; n=40), Unidades Quirúrgicas (21,8%; n=27), UCIs (19,3%; n=24) y extrahospitalarios (26,6%; n=33). Estos datos se muestran en la figura 20 y en la tabla 18. Se observó un aumento significativo en el número de pacientes procedentes de Áreas Médicas ( $p=0,017$ ), Áreas Quirúrgicas ( $p=0,039$ ) y en los pacientes extrahospitalarios ( $p=0,002$ ) y una disminución significativa de los pacientes procedentes de UCIs ( $p=0,0016$ ) cuando se comparan ambos periodos.



**Figura 20.** Distribución de pacientes con aislados de *K. pneumoniae* productores de BLEE en diferentes áreas de hospitalización y en el medio extrahospitalario.

**Tabla 18.** Distribución de los aislados clínicos de *K. pneumoniae* productores de BLEE identificados en el Hospital Universitario Ramón y Cajal desde su primera detección en 1989 y pacientes infectados o colonizados con estos aislados en diferentes áreas.

Año	Aislados <i>K. pneumoniae</i>		Pacientes infectados o colonizados con <i>K. pneumoniae</i> productor de BLEE			
	Totales	con BLEE (%)	UCI	Quirúrgicos	Médicos	Extrahospitalarios
1989	258	1 (0,4)	1	0	0	0
1990	269	7 (2,6)	2	2	0	1
1991	315	8 (2,5)	4	0	1	0
1992	302	11(3,6)	5	1	0	0
1993	240	3 (1,2)	2	0	1	0
1994	252	1 (0,4)	0	0	0	1
1995	317	4 (1,3)	3	0	0	0
1996	240	2 (0,8)	0	0	2	0
1997	289	35 (12,1)	7	0	1	0
1998	336	61 (18,1)	6	1	4	0
1999	364	7 (1,9)	1	0	5	0
2000	450	19 (4,2)	3	1	1	2
2001	488	23 (4,7)	4	3	4	1
2002	715	18 (2,5)	5	2	2	4
2003	798	25 (3,1)	4	5	4	6
2004	948	27 (2,8)	2	1	6	8
2005	720	22 (3,0)	2	6	3	6
2006	1384	63 (4,5)	7	10	21	8
TOTAL	8685	337 (3,8)	58	32	55	37

Los 62 aislados estudiados en el periodo 1989-2000 se obtuvieron de muestras respiratorias (n=22; 35,5%), orinas (n=14; 22,6%), sangre (n=11; 17,7%), torundas rectales (n=5; 8,1%), heridas (n=4; 6,5%), catéteres (n=3; 4,8%) y otros (n=3; 4,8%). Los 124 aislados estudiados durante el periodo 2001-2006 se recogieron de los siguientes tipos de muestras: orinas (n=59; 47,6%), respiratorias (n=23; 18,5%), sangre (n=14; 11,3%), heridas (n=13; 10,5%), torundas rectales (n=8; 6,5%), catéteres (n=3; 2,4%), líquido orgánico (n=2; 1,6%), bilis (n=1; 0,8%), exudado (n=1; 0,8%).

Las muestras de orinas con *K. pneumoniae* productores de BLEE aumentaron significativamente ( $p=0,0007$ ) (14/62 vs 59/124) del periodo 1989-2000 y el 2001-2006 y se observó un descenso no significativo en las muestras procedentes del tracto respiratorio (22/62 vs 23/124) cuando se comparan los periodos 1989-2000 y el 2001-2006.

## 2.2. Caracterización de BLEE

Se observó un aumento en el número de aislados productores del periodo 1989-2000 (n=62) a 2001-2005 (n=78). La distribución de los diferentes grupos de BLEE en los dos periodos de estudio fue similar: tipo SHV (40,3% vs 41,0%); tipo TEM (27,4% vs 24,4%); tipo CTX-M (32,3% vs 34,6%). Las distintas variantes identificadas en 1989-2000 fueron: 25 SHV (12 SHV-2a, 12 SHV-2 y 1 SHV-5); 17 TEM-4; 20 CTX-M (19 CTX-M-10 y 1 CTX-M-9) (Coque y cols., 2002). En el periodo 2001-2005 las BLEE caracterizadas fueron 32 SHV (20 SHV-12, 7 SHV-2, 3 SHV-11 y 2 SHV-5); 27 CTX-M (13 CTX-M-15, 9 CTX-M-10, 4 CTX-M-14 y 1 CTX-M-9) y 19 TEM (15 TEM-4, 1 TEM-24, 1 TEM-52, 1 TEM-110 y 1 TEM-133) (Tabla 19 y Figura 21).

**Tabla 19.** Características epidemiológicas de los aislados de *K. pneumoniae* productores de BLEE obtenidos de 2001 a 2005.

BLEE	Pulso tipo (n° aislados)	Fecha	Muestra (n° aislados)	Área (n° pacientes)	Punto isoelectrico	Patrón restricción (Tamaño plásmido kb; n° aislados) <sup>e</sup>	Resistencias Asociadas <sup>f</sup>
TEM-4	<u>Kp41T</u> (13) <sup>a</sup>	2001-05	Respiratoria (3) Orina (9)	UCI Cardiopediatría (2) Pediatría (1), Extrahospitalario (9) <sup>b</sup>	5,9+7,6	pRYCE26 (60; 8) pRYCE11 (85; 3)	(Sm) <sup>g</sup> , <u>Gm</u> <sup>h</sup> , (Km), Tb, (Ne), (Na), (Su), (Tp), (Cl)
			Catéter (1)	Dermatología (1)			
	<u>Kp70T</u> (1)	2004	Herida (1)	UCI Cardiopediatría (1)	ND <sup>d</sup>	pRYCE11(85; 1)	Gm, Tb
	<u>Kp78T</u> (1)	2005	Orina (1)	Extrahospitalario (1)	5,9+7,6	ND	Gm, Tb, Nm
TEM-24	<u>Kp79T</u> (1)	2005	Orina (1)	Extrahospitalario (1)	5,9+7,6	ND	Km, Tb, Na, Cp, Su, Tp, Cl
TEM-52	<u>Kp74T</u> (1)	2004	Orina (1)	Extrahospitalario (1)	ND	pRYCE37 (23; 1)	~
TEM-110	<u>Kp42T</u> (1)	2002	Orina (1)	Extrahospitalario (1)	5,4+5,9+7,6	pRYCE35 (50/85; 1)	<u>Gm</u> , Tb
TEM-133	<u>Kp72T</u> (1)	2004	Orina (1)	Endocrinología (1)	ND	ND	Gm, Tb, Ne, <u>Te</u>
SHV-2	<u>Kp56S</u> (1)	2001	Respiratoria (1)	UCI Cardiología(1)	7,6	pRYCE27 (40; 1)	Km
	<u>Kp57S</u> (2)	2001	Respiratoria (2)	UCI Cardiopediatría (2)	7,6	ND	(Sm), <u>Gm</u> , Km, Tb, (Su), Cl
	<u>Kp58S</u> (1)	2002	Sangre (1)	Cirugía Torácica (1)	7,6	pRYCE38 (40; 1)	Sp, Km, Te, Su, Cl
	<u>Kp59S</u> (1)	2003	Orina (1)	Neurocirugía (1)	7,6	pRYCE38 (40; 1)	Sp, Te, Su
	<u>Kp60S</u> (1)	2003	Orina (1)	Extrahospitalario (1)	7,6	ND	Sm, Su
	<u>Kp71S</u> (1)	2004	Orina (1)	Extrahospitalario (1)	ND	ND	Sm, Sp, Gm, Km, Ap, Nm, Na, Cp, Su, Tp, Te, Cl
SHV-5	<u>Kp48S</u> (1)	2002	Herida (1)	Pediatría (1)	ND	ND	Gm, Km, Tb, Ak, Ne, Na, Cl, Su, Tp, Te
	<u>Kp80S</u> (1)	2005	Orina (1)	Extrahospitalario (1)	ND	ND	Tb, Na, Su, Tp, Te
SHV-11	<u>Kp61S</u> (2)	2002	Orina (2)	Urología (1), Extrahospitalario (1)	7,6	ND	Sm, Km, Na, Su, Cl
	<u>Kp62S</u> (1)	2003	Orina (1)	Extrahospitalario (1)	7,6	ND	Sm, Sp, Na, Cp, Su, Tp, Te, Cl



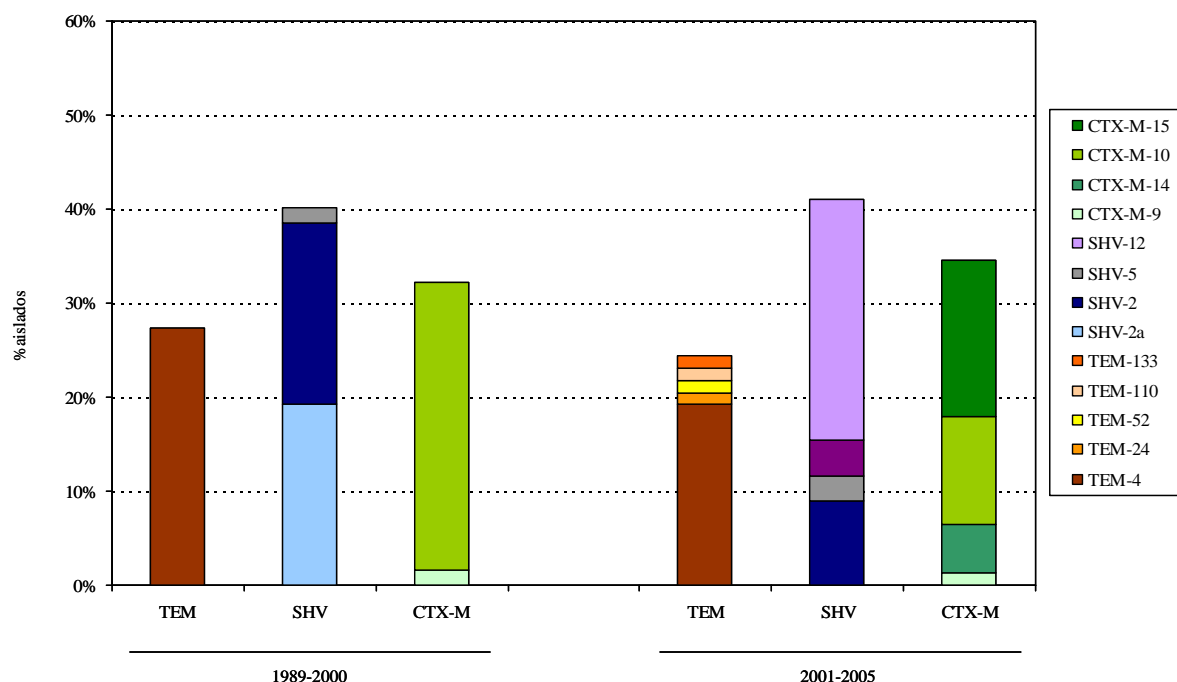
Tabla 19. Continuación .

BLEE	Pulsotipo (n° aislados)	Fecha	Muestra (n° aislados)	Área (n° pacientes)	Punto isoelectrico	Patrón restricción (Tamaño plásmido kb; n° aislados) <sup>e</sup>	Resistencias Asociadas <sup>f</sup>
SHV-12	<u>Kp49S</u> (11) <sup>a</sup>	2001-03	Orina (2)	Nefrología (2)	7,6+8,2	pRYCE28 (60; 4)	(Sp) <sup>g</sup> , Su, <u>Tp<sup>h</sup></u>
			Herida (2)	Fibrosis Quística (1), Urología (1),			
			Sangre (1)	UCI Neurocirugía(2)			
			Torunda rectal (2)	UCI Cardiopediatría (1)			
			Bilis (1)	Gastroenterología (1)			
			Respiratoria (3)	UCI Cardiología(2),			
				Ortopedia Infantil (1)			
	Kp50S (1)	2003	Respiratoria (1)	UCI Neurocirugía(1)	5,4+7,6+8,2	ND	Sm, Sp, Km, Tb, Ne, Ak, Na, Su, Tp, Te, Cl
	<u>Kp63S</u> (1)	2003	Catéter (1)	Neurología (1)	7,6+8,2	pRYCE38 (40; 1)	Sm, Sp, Su
	<u>Kp76S</u> (1)	2004	Orina (1)	Extrahospitalario (1) <sup>b</sup>	ND <sup>d</sup>	pRYCE32 (60; 1)	Km, Nm, Su, Te
CTX-M-9	Kp77S (1)	2004	Herida (1)	Enf. Infecciosas (1) <sup>c</sup>	ND	ND	Te
	<u>Kp75S</u> (1)	2004	Herida (1)	Cirugía General Digestivo (1)	ND	pRYCE33 (60; 1)	~
	<u>Kp81S</u> (2)	2005	Torunda rectal (1)	UCI Cardiopediatría (1)	ND	ND	Sm, Sp, (Km), Su, Tp
			Orina (1)	Cirugía Cardiopediátrica (1)			
	<u>Kp83S</u> (1)	2005	Sangre (1)	UCI Médica (1)	ND	ND	Km ,Tb, Ak, Ne, Na, Cp, Su, Tp, Cl
	<u>Kp84S</u> (1)	2005	Orina (1)	Extrahospitalario (1)	ND	ND	Sm, Sp, Na, Cp Su, Tp, Te,Cl
	<u>Kp43C</u> (1)	2003	Orina (1)	Extrahospitalario (1)	8,1	pRYCE36 (100; 1)	Sp, Su, <u>Tp</u> , <u>Te</u>
	<u>Kp45C</u> (2)	2001	Herida (1)	Cirugía General Digestivo (2)	7,6+8,1	pRYCE39 (60; 1)	Sm, Km, (Tb), Na, Su, Tp, Cl
			Sangre (1)				
	<u>Kp85C</u> (1)	2005	Torunda rectal (1)	Nefrología (1)	ND	ND	Sm, Sp, Gm,Km, Tb, Ak, Nm, Ne, Na, Cp, Su, Tp, Te, Cl
CTX-M-10	<u>Kp86C</u> (1)	2005	Orina (1)	Extrahospitalario (1)	ND	ND	Km, Tb, Te
	<u>Kp51C</u> (1)	2001	Sangre (1)	Medicina Interna (1)	8,1	pRYCE29 (40; 1)	~

Tabla 19. Continuación.

BLEE	Pulso tipo (n° aislados)	Fecha	Muestra (n° aislados)	Área (n° pacientes)	Punto isoelectrico	Patrón restricción (Tamaño plásmido kb; n° aislados) <sup>e</sup>	Resistencias Asociadas <sup>f</sup>
CTX-M-10	<u>Kp52C(2)</u> <sup>a</sup>	2001-02	Orina (1) Respiratoria (1)	Extrahospitalario (1) <sup>b</sup> Enf. Infecciosas (1) <sup>c</sup>	7,6+8,1	pRYCE30 (40; 1)	~
	<u>Kp55C(2)</u>	2003-05	Orina (2)	Traumatología (2)	7,6+8,1	pRYCE31 (30; 1)	~
	<u>Kp53C(1)</u>	2003	Sangre (1)	Oncología (1)	8,1	pRYCE30 (40; 1)	~
	<u>Kp54C(1)</u>	2003	Respiratoria (1)	UCI Neurología (1)	7,6+8,1	pRYCE30 (40; 1)	Sp, Na, Tp, Te, Cl
	<u>Kp64C(1)</u>	2004	Respiratoria (1)	Medicina Interna (1)	ND <sup>d</sup>	ND	~
	<u>Kp87C(1)</u>	2005	Respiratoria (1)	Enf. infecciosas (1)	ND	ND	~
CTX-M-15	<u>Kp47C(9)</u>	2002-05	Orina (5) Herida (2) Respiratoria (1) Torunda rectal (1)	UCI Cardiopediatría (1), Cardiovascular (1) Cardiología (1), Nefrología (2) Extrahospitalario (1), Traumatología (1), Cirugía Vascular (2)	UCI 7,6	pRYCE34 (180; 1)	(Sm, Gm, Km, Tb, Ap) <sup>g,h</sup> , Na, (Cp, Su)
	<u>Kp66C(1)</u>	2004	Orina (1)	Nefrología (1)	ND	pRYCE34 (180;1)	Km, Na, Cp
	<u>Kp67C(1)</u>	2004	Orina (1)	UCI Cardiopediatría (1)	ND	ND	Sm, Gm, Km, Tb, Su, Na, Cp, Tp, Te, Cl
	<u>Kp88C(1)</u>	2005	Torunda rectal (1)	Cirugía General Digestivo (1)	ND	ND	Gm, Km, Tb, Su, Te
	<u>Kp89C(1)</u>	2005	Orina (1)	Cirugía Vascular (1)	ND	ND	Gm, Km, Tb, Na, Cp, Su

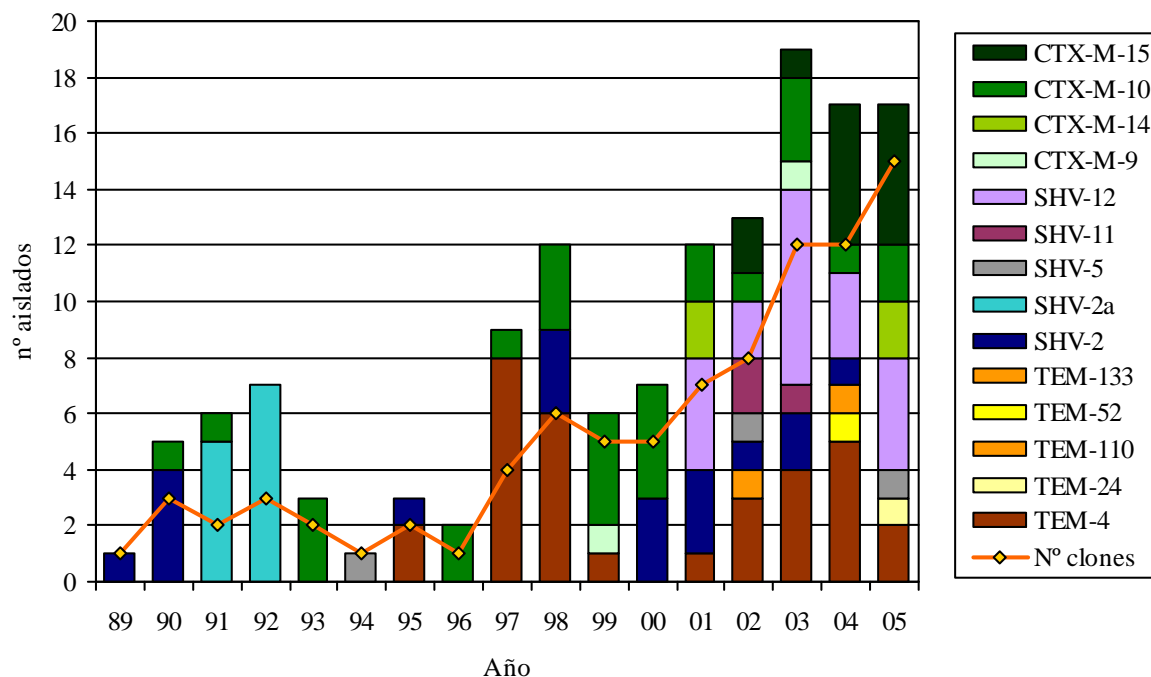
**a.** Los aislados que aparecen subrayados indican transferencia del gen *blaBLEE* por conjugación. **b.** Los pacientes extrahospitalarios incluyen aquellos procedentes de urgencias y de atención primaria. **c.** Enf. Infecciosas: Enfermedades infecciosas. **d.** ND: no determinado, la identificación de las BLEE se hizo a nivel genético aunque la presencia de otras BLEE no puede ser descartada. **e.** El tipo de plásmido se determinó por digestión de ADN plasmídico con distintas enzimas de restricción. ND: no determinado (corresponde a aquellos aislados en los que no se obtuvo transconjugante o el ADN plasmídico se degradó. **f.** Los aislados con sensibilidad intermedia se consideran resistentes. **g.** Las resistencias a los antibióticos entre paréntesis indican sensibilidad variable a ese antibiótico. **h.** Las resistencias que aparecen subrayadas indican transferencia de la misma por conjugación. (~~) aislados sensibles a todos los antibióticos estudiados. Ak: amicacina; Ap: apramicina; Cl: cloranfenicol; Cp: ciprofloxacino; Gm: gentamicina; Km: kanamicina; Na: ac. nalidíxico; Ne: netilmicina; Nm: neomicina; Sm: estreptomina; Sp: espectinomina; Su: sulfonamidas; Tb: tobramicina; Te: tetraciclina; Tp: trimetoprim.



**Figura 21** Distribución de los distintos tipos de BLEE obtenidos de aislados de *K. pneumoniae* en los periodos 1989-2000 y 2001-2005.

Sin embargo, durante el periodo 2001-2005 se observó un aumento en la diversidad de BLEE, debido principalmente a la aparición de enzimas no detectadas con anterioridad en aislados de *K. pneumoniae* en nuestra área geográfica, como es el caso de las variantes de TEM (-24, -52, -110, -133), SHV (-11, -12) y CTX-M (-14, -15). También se observó la persistencia de enzimas identificadas previamente como TEM-4, SHV-2, CTX-M-9 y CTX-M-10. Algunos de los tipos presentes en el periodo 1989-2000, como SHV-2a, no se detectaron en el segundo periodo (Figura 22).

Cabe destacar la aparición de enzimas CTX-M-15, ampliamente diseminadas en distintas especies de enterobacterias y en diferentes países, en el año 2002 (n=2) y su aumento durante el año 2004-05 (n=11), asociada mayoritariamente a aislados hospitalarios. También es reseñable que durante el periodo 2002-2005 muy pocos aislados son productores de enzimas del grupo CTX-M-9, siendo las únicas variantes encontradas CTX-M-9 (n=1) y CTX-M-14 (n=4). Este dato contrasta con la situación descrita en *E. coli* donde estas variantes son mayoritarias.



**Figura 22.** Distribución de BLEE y clones de *K. pneumoniae* durante el periodo 1989-2005.

## 2.3. Estructura poblacional

### 2.3.1 PFGE

En el periodo 1989-2000 se caracterizaron 31 pulsotipos, identificándose solamente un clon epidémico productor de TEM-4 responsable de un brote en la UCI de cardiopediatría durante 1997 y 1998 (Coque y cols., 2002). En los años 2002-2005 se caracterizaron 42 clones diferentes y se identificaron algunos clones epidémicos asociados con TEM-4, SHV-12 y CTX-M-15 (Tabla 19).

En 1989-2000, TEM-4 se identificó principalmente en clones de pacientes ingresados en la UCI de cardiopediatría y uno de ellos fue causante de un brote durante 1997 y 1998 (Asensio y cols., 2000; Coque y cols., 2002). En 2001-2005, la mayoría de los aislados de TEM-4 (86,6%; 13/15) presentaron el mismo patrón de PFGE (Kp41T), no relacionado con ninguno de los descritos en el periodo anterior. El clon Kp41T fue identificado en su mayoría en pacientes extrahospitalarios (69,2%; 9/13) y en menor medida de pacientes ingresados en UCIs (15,4%; 2/13) y de pacientes de áreas médicas (15,4%; 2/13).

El 55,0% (11/20) de los aislados productores de SHV-12 presentaron el mismo perfil de PFGE (Kp49S) identificado desde 2001 a 2003 en diferentes áreas del hospital (UCIs y médicas, 45,4%; 5/11, ambas; y quirúrgicas 9,1%; 1/11).

La mayoría de los aislados productores de CTX-M-15 (69,2%; 9 /13) mostraron un mismo patrón de PFGE (Kp47C). Una gran parte de ellos fueron identificados en pacientes hospitalizados en distintas Áreas Quirúrgicas y UCIs (22,2%; 2/9 ambas), Áreas Médicas (44,5%; 4/9) y sólo un aislado fue identificado en un paciente extrahospitalario (11,1%; 1/9) (Tabla 19).

### 2.3.2 Grupos filogenéticos

Los clones de *K. pneumoniae* productores de BLEE aislados entre 1989 y 2005 correspondían al grupo filogenético KpI (75,6%), seguido del grupo KpIII (19,2%) y del grupo KpII (1,3%). El 86,0% de los aislados del grupo KpIII fueron productores de CTX-M-10. Se estableció una clara asociación entre los aislados pertenecientes al grupo KpIII y la presencia de la beta-lactamasa cromosómica LEN (Tabla 20).

**Tabla 20.** Asociación de tipos de BLEE y grupos filogenéticos en aislados de *K. pneumoniae*

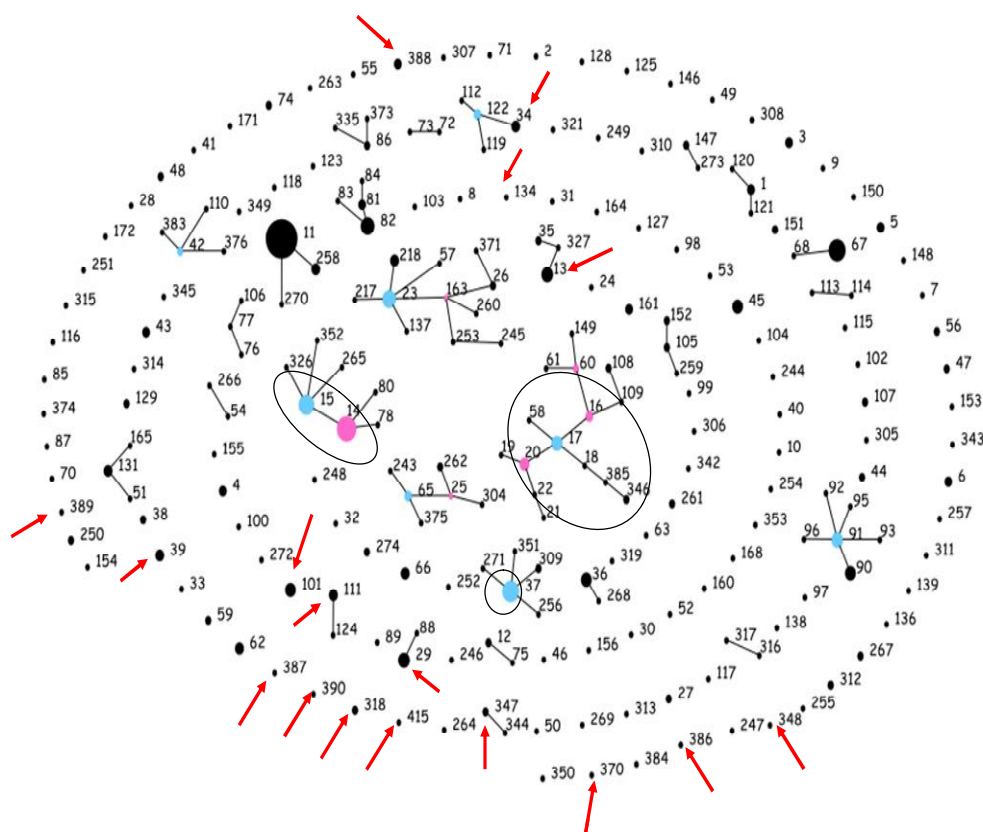
Filogrupo	Nº aislados (%)	Tipo de BLEE (nº de clones)		
		TEM	SHV	CTX-M
KpI	59 (75,6)	TEM-4 (8)	SHV-2 (13)	CTX-M-9 (1)
		TEM-52 (1)	SHV-2a (4)	CTX-M-14 (2)
		TEM-110 (1)	SHV-5 (3)	CTX-M-10 (9)
		TEM-133 (1)	SHV-11 (2)	CTX-M-15 (5)
			SHV-12 (9)	
KpII	1 (1,3)	-	-	CTX-M-9 (1)
KpIII	15 (19,2)	TEM-4 (1*)	SHV-2 (1)	CTX-M-10 (13*)
ND	3 (3,9)	TEM-24 (1)	SHV-2 (1)	CTX-M-14 (1)

ND. No determinado \* positivos para el gen de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica LEN

### 2.3.3 MLST

Los resultados del análisis por MLST correspondientes a los 40 aislados de *K. pneumoniae* productores de las BLEE más prevalentes encontradas en este estudio (SHV-12, TEM-4, CTX-M-15 y CTX-M-10) con distinto perfil de PFGE se encuentran representados en la figura 23 y la tabla 21.

Los datos obtenidos muestran que existe una gran diversidad entre los aislados estudiados, no encontrándose ninguna asociación entre ST y BLEE. Determinadas ST fueron identificadas en distintos aislados productores de la misma o de distinta BLEE. Dentro de los 19 aislados productores de CTX-M-10, tres de ellos se asociaron con ST20, otros tres con ST388 y finalmente dos aislados se agrupaban en ST347. De los siete aislados productores de TEM-4, tres se asociaron a ST14 y el resto con diferentes ST. Dentro ST14 también se incluye un aislado de SHV-12. Cabe destacar también la presencia de ST15 en un aislado productor de CTX-M-15, que pertenece al mismo CC que ST14. Dentro de nuestro estudio se incluye la descripción de nuevas ST (ST346, ST347, ST348, ST370, ST371, ST385, ST386, ST387, ST388 y ST389), y de nuevos alelos para los genes *gap* (alelos 41, 45 y 46), *infB* (alelos 46 y 47), *mdh* (alelos 59 y 60), *phoE* (alelos 81, 82, 83 y 84) y *tonB* (alelo 108).



**Figura 23.** Representación mediante e-BURST de la estructura poblacional de *K. pneumoniae* utilizando las ST relacionadas y no relacionadas de la base de datos de MLST de *K. pneumoniae*. Las ST caracterizadas en este estudio están señaladas con una flecha roja o dentro de un círculo. Los círculos azules representan a los fundadores de cada complejo clonal, los círculos rosa corresponden a los subgrupos de un fundador y los círculos negros al resto de singletons. La unión entre dos ST representa una única diferencia (single-locus) entre ellos. Este diagrama no representa la distancia genética entre ST no relacionadas y los complejos clonales.

**Tabla 21.** Resultados del análisis mediante MLST de aislados representativos de *K. pneumoniae* productor de BLEE.

ST	BLEE	Pulso tipo	Filogrupo	Año	Muestra	<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>
ST13	CTX-M-15	Kp89C	KpI	2005	Orina	2	3	1	1	10	1	19
ST13	CTX-M-10	Kp12C	KpI	1990	Broncoaspirado	2	3	1	1	10	1	19
ST13	TEM-4	Kp6T	KpI	1997	Sangre	2	3	1	1	10	1	19
ST14	SHV-12	Kp76S	KpI	2004	Orina	1	6	1	1	1	1	1
ST14	TEM-4	Kp8T	KpI	1995	Espeto	1	6	1	1	1	1	1
ST14	TEM-4	Kp20T	KpI	1997	Broncoaspirado	1	6	1	1	1	1	1
ST14	TEM-4	Kp27T	KpI	1999	Broncoaspirado	1	6	1	1	1	1	1
ST15	CTX-M-15	Kp67C	KpI	2002	Orina	1	1	1	1	1	1	1
ST16	CTX-M-15	Kp47C	KpI	2004	Orina	2	1	2	1	4	4	4
ST16	CTX-M-15	Kp66C	KpI	2004	Orina	2	1	2	1	4	4	4
ST20	CTX-M-10	Kp52C	KpI	2001	Espeto	2	3	1	1	4	4	4
ST20	CTX-M-10	Kp32aC	KpI	2000	Orina	2	3	1	1	4	4	4
ST20	CTX-M-10	Kp32C	KpI	2000	Orina	2	3	1	1	4	4	4
ST23	CTX-M-10	Kp36C	KpI	2000	Orina	2	1	1	1	9	4	12
ST29	TEM-4	Kp70T	KpI	2004	Herida	2	3	2	2	6	4	4
ST34	CTX-M-10	Kp54C	KpI	2003	Respiratoria	2	3	6	1	9	7	4
ST37	SHV-12	Kp63S	KpI	2003	Catéter	2	9	2	1	13	1	16
ST37	TEM-4	Kp41T	KpI	2001	Broncoaspirado	2	9	2	1	13	1	16
ST39	SHV-12	Kp50S	KpI	2003	Orina	2	1	2	4	9	1	14
ST39	SHV-12	Kp84S	KpI	2005	Orina	2	1	2	4	9	1	14
ST101	SHV-12	Kp83S	KpI	2005	Sangre	2	6	1	5	4	1	6
ST111	CTX-M-10	Kp4C	KpI	1993	Sangre	2	1	5	1	17	4	42
ST134	CTX-M-15	Kp88C	KpI	2005	Torunda rectal	3	1	2	1	1	1	4
ST318	CTX-M-10	Kp30C	KpIII	1999	Orina	16	24	21	31	68	22	67
ST346	SHV-12	Kp81S	KpI	2005	Torunda rectal	2	20	1	1	26	1	4
ST346	SHV-12	Kp77S	KpI	2004	Herida	2	20	1	1	26	1	4
ST347	CTX-M-10	Kp15C	KpIII	1993	Sangre	16	24	21	27	47	22	67
ST347	CTX-M-10	Kp4aC	KpIII	1998	Orina	16	24	21	27	47	22	67
ST348	TEM-4	Kp78T	KpI	2005	Orina	2	1	20	1	12	15	16
ST370	SHV-12	Kp75S	KpI	2004	Herida	41	47	1	14	1	1	12
ST371	CTX-M-10	Kp39C	KpI	1996	Orina	2	46	1	1	9	1	18
ST385	SHV-12	Kp49S	KpI	2002	Torunda rectal	2	20	1	1	4	1	4
ST386	CTX-M-10	Kp22C	KpIII	1997	Espeto	16	18	43	31	42	22	45
ST387	CTX-M-10	Kp87C	KpIII	2005	Respiratoria	45	18	21	49	26	22	108
ST388	CTX-M-10	Kp26C	KpIII	1998	Espeto	16	24	59	27	29	22	105
ST388	CTX-M-10	Kp26aC	KpIII	1999	Broncoaspirado	16	24	59	27	29	22	105
ST388	CTX-M-10	Kp53C	KpIII	2003	Sangre	16	24	59	27	29	22	105
ST389	CTX-M-10	Kp55C	KpIII	2003	Orina	46	18	21	27	81	22	105
ST390	CTX-M-10	Kp13C	KpIII	1991	Heces	45	18	21	49	82	22	108
ST415	CTX-M-10	Kp51C	KpIII	2001	Sangre	45	24	21	27	84	22	67

ST: secuencia tipo.

## 2.4. Caracterización de los plásmidos

Los genes *bla*<sub>BLEE</sub> se transfirieron por conjugación en el 81,0% (28/35) de los aislados estudiados en el periodo 1989-2000 (Coque y cols., 2002) y en el 87,0% (68/78) de los aislados obtenidos en los años 2001 y 2005. El análisis de los patrones de restricción mostró la presencia de plásmidos epidémicos asociados a la producción de TEM-4, SHV-12, CTX-M-10 y CTX-M-15 (Tabla 19).

Se identificaron dos plásmidos portadores de *bla*<sub>TEM-4</sub>; pRYCE11 (85 Kb) observado en dos clones (Kp41T y Kp70T) identificados entre 2002 y 2004 mayoritariamente en el ámbito extrahospitalario (n=9) y que presentaba un perfil de restricción idéntico al plásmido asociado con un brote en la UCI de Cardiopediatría de nuestro hospital que perduró desde 1995 hasta 1999 (Coque y cols., 2002); y el plásmido pRYCE26 (60 Kb) que sólo se encontró en los clones Kp41T desde 2001 a 2002.

Los plásmidos portadores de *bla*<sub>SHV-12</sub> se clasificaron en cuatro perfiles diferentes (pRYCE28, pRYCE32, pRYCE33 y pRYCE38). El plásmido pRYCE28 (60 Kb) caracterizado en el clon Kp49S, fue identificado en aislados de diferentes Áreas del hospital (UCIs, n=5; Médicas n=5; y Quirúrgicas n=1) desde 2001 hasta 2003. El plásmido pRYCE38 (40 Kb) se encontró tanto en un aislado productor de SHV-12 (clon Kp63S) como en dos clones distintos de SHV-2 (Kp58S y Kp59S) todos ellos en Áreas Quirúrgicas en los años 2002 y 2003. El plásmido pRYCE32 se asoció al clon Kp76S de un paciente extrahospitalario y finalmente, el plásmido pRYCE33 se detectó en el clon Kp75S aislado de un paciente del Área Quirúrgica.

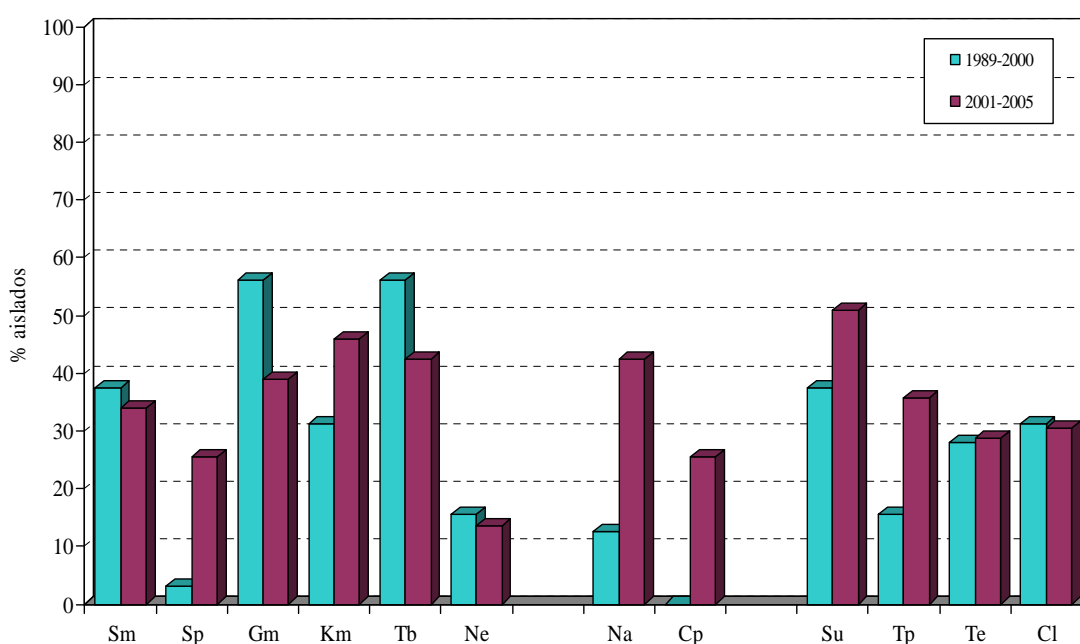
En el periodo 1989-2000, los plásmidos portadores de *bla*<sub>CTX-M-10</sub> (n=8) presentaron distintos patrones de restricción, sin que existiera ningún perfil mayoritario (Coque y cols., 2002). En el periodo 2000-2005, los plásmidos portadores de *bla*<sub>CTX-M-10</sub> se clasificaron en 3 perfiles de restricción distintos (pRYCE29, pRYCE30 y pRYCE31). El plásmido pRYCE30 (40 Kb) se identificó en tres clones (Kp52C, Kp53C y Kp54C), aislados desde 2001 a 2003 en diferentes Áreas (UCI, n=1; Médicas, n=1; y extrahospitalario, n=1).

El gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> fue siempre localizado en un plásmido de 180 Kb (pRYCE34), aislado desde 2002 hasta 2004 en distintas Áreas, en su mayoría hospitalarias (UCIs, n=2; Médicas, n=4; Quirúrgicas, n=1; extrahospitalario, n=1).



## 2.5 Sensibilidad a antibióticos no beta-lactámicos

El cálculo de los porcentajes de sensibilidad se realizó considerando sólo un aislado por cada clon o más de uno si presentaba distintos fenotipos. Los patrones de sensibilidad a antibióticos no beta-lactámicos revelaron un aumento significativo de las resistencias a trimetoprim (15,6% vs 35,6%;  $p=0,04$ ) y a ácido nalidíxico (12,5% vs 42,4%;  $p=0,003$ ) comparando ambos periodos. Por el contrario, las resistencias a gentamicina (56,2% vs 39,0%) y tobramicina (56,2% vs 42,2%) descendieron durante 2001-2005, aunque sin significancia estadística (Figura 24).



**Figura 24.** Porcentaje de aislados de *K. pneumoniae* productor de BLEE resistentes a diferentes antimicrobianos. Cl: cloranfenicol; Cp: ciprofloxacino; Gm: gentamicina; Km: kanamicina; Na: ácido nalidíxico; Ne: netilmicina; Sm: estreptomina; Sp: espectinomicina; Su: sulfonamidas. Tb: tobramicina; Te: tetraciclina; Tp: trimetoprim.

Estos resultados están asociados a los distintos tipos de BLEE descritos (Coque y cols., 2002; Tabla 19). Los aislados productores de enzimas tipo TEM de ambos periodos mostraron unas altas tasas de resistencia a gentamicina (94,4%) y tobramicina (88,8%), la resistencia a gentamicina fue transferible en la mayoría de los casos (66,6%).

En cuanto a los aislados productores de SHV, los aislados productores de SHV-2 y SHV-2a presentaron resistencia a gentamicina (75,0%), kanamicina (65,0%), tobramicina (60,0%) y sulfonamidas (70,0%), siendo transferible la resistencia a gentamicina (82,3%), tobramicina (52,9%) y kanamicina (29,4%). Los aislados productores de SHV-12 descritos en 2001-2005 fueron resistentes en su mayoría a trimetoprim y sulfonamidas (72,7%, ambos).

El 90,0% de los aislados productores de CTX-M-10 de ambos periodos fueron sensibles a todos los antibióticos no beta-lactámicos estudiados.

Los aislados productores de CTX-M-15 fueron mayoritariamente resistentes al ácido nalidíxico (92,3%) y a kanamicina (84,6%).

### 3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE AISLADOS PRODUCTORES DE CTX-M-2, CTX-M-14 Y SHV-12

El estudio de la epidemiología molecular de los microorganismos productores de las BLEE y de sus entornos genéticos se centró en aquellos asociados a dos de las enzimas más prevalentes en nuestro medio, CTX-M-14 y SHV-12, con el objetivo de aumentar su conocimiento, en particular las posibles causas asociadas a su rápida diseminación. Asimismo, a pesar de que en nuestro país su prevalencia es muy baja, se analizó a nivel molecular el único aislado productor de CTX-M-2 encontrado en nuestro hospital, debido a su origen comunitario y a las relaciones de España con países de Sudamérica donde CTX-M-2 es una de las BLEE prevalentes.

#### 3.1 CTX-M-2

##### 3.1.1 Características del aislado productor de CTX-M-2

El aislado de *E. coli* productor de CTX-M-2 (VS27C), se obtuvo de una muestra de heces de un voluntario sano en el estudio llevado a cabo en el año 2003 (ver tabla 12). Los ensayos de conjugación tanto en medio sólido como líquido fueron negativos. El perfil de plásmidos en la cepa salvaje, obtenido mediante el método Kado y Liu, determinó la presencia de tres plásmidos de 70, 40 y 5 Kb y otros tres menores de 3 Kb.

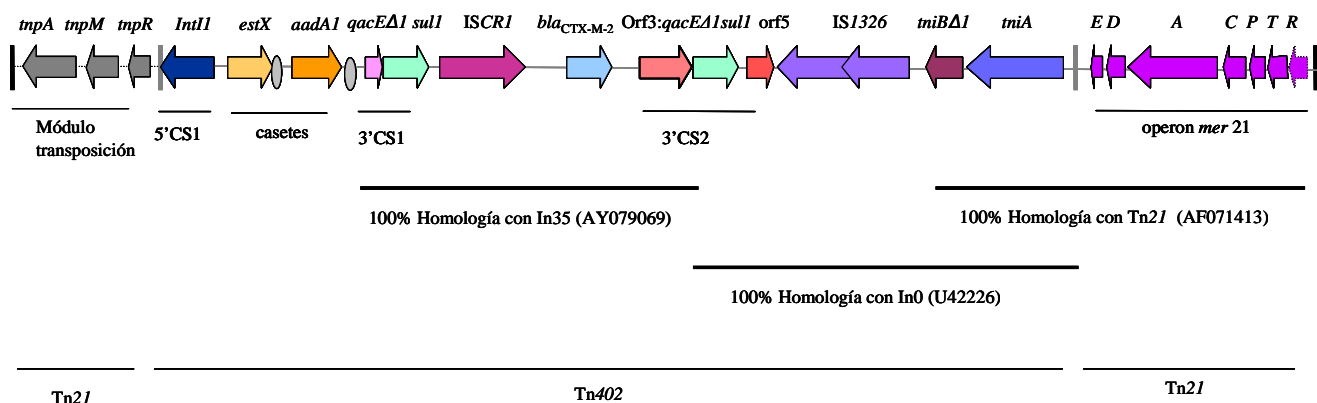
##### 3.1.2 Caracterización del entorno genético del gen *bla*<sub>CTX-M-2</sub>

Los experimentos de PCR solapante y la posterior secuenciación de los amplicones obtenidos, identificaron la presencia del gen *bla*<sub>CTX-M-2</sub> en un elemento de 15.882 pb, correspondiente a un transposón defectivo derivado de la familia de Tn402, que se denominó In117 (GenBank DQ125241) (Figura 25).

La región del segmento conservado 5'CS1 incluye una copia de la integrasa *intI1* con un promotor Pc idéntico al que se encuentra en el In1 del plásmido R46 (GenBank AY046276) formado por los hexámeros TGGACA (posición -35) y TAAACT (posición -10) separados por 17 pb. (Partridge y cols., 2001a). Los cambios en las secuencias de las posiciones -35 y -10 del promotor Pc dan lugar a promotores fuertes, intermedios o débiles debido a las variaciones en la expresión de los niveles de resistencia de los casetes de genes (Collis y cols., 1995). El promotor de In1 tiene un carácter intermedio (Lévesque y cols., 1994) y, aunque su descripción es menos frecuente que otros promotores Pc fuertes o débiles,

se ha encontrado en integrones específicos de clase 1. Entre los segmentos conservados 5'CS1 y 3'CS1 se identificó en la zona variable los casetes de genes *estX-aadA1* (Figura 25). El gen *estX*, que confiere resistencia a estreptotricina, mostró una identidad a nivel de aminoácidos del 90% con *sat-1* del Tn1825. El gen *estX* presenta un 40,0% de homología con proteínas anotadas como hipotéticas esterasas o hidrolasas.

La región de 5.585 pb entre los segmentos conservados 3'CS1 y 3'CS2, que incluye los genes correspondientes a *ISCR1* y *bla<sub>CTX-M-2</sub>*, mostró una homología del 100% con la secuencia de In35 (GenBank AY079169), un elemento genético similar asociado a *bla<sub>CTX-M-2</sub>* y prevalente en Sudamérica (Figura 25). La secuencia de 6.900 pb a partir de 3'CS2, que incluye a *qacEΔ1*, *sul1* y *orf5* seguidos de *IS1326* (perteneciente a la familia de *IS21*) y el módulo de transposición truncado (*tniBΔ1-tniA*) del Tn402, era idéntica a la del integrón de clase 1 In0 (U42226). La secuencia repetida e inversa (IR) y el gen de la transposasa del Tn21 *tnpR* que se encuentran corriente arriba de la integrasa *intI1*, no se detectaron en este caso. Por el contrario, se identificó la presencia del operón *mer* de Tn21 corriente abajo de *tniA* (Figura 25).



**Figura 25.** Representación esquemática del elemento In117 (GenBank DQ125241) que contiene a *bla<sub>CTX-M-2</sub>*. Las barras verticales simbolizan las secuencias repetidas e inversas del integrón (gris) y de Tn21 (negro). Los círculos representan los elementos de 59 pb de los casetes de genes. Los números de acceso de GenBank se encuentran entre paréntesis.

### 3.2. CTX-M-14

#### 3.2.1 Aislados, pacientes y origen de las muestras

Se analizaron 61 aislados de *E. coli* productores de CTX-M-14, pertenecientes a 56 individuos, obtenidos entre 2001 y 2005. Los aislados pertenecen a los estudios de portadores fecales, muestras de voluntarios sanos, convivientes y aislados clínicos de *E. coli* (Tabla 22).

**Tabla 22.** Características epidemiológicas de los aislados de *E. coli* productores de CTX-M-14 identificados en 2001-2005.

Muestras (n° aislados)	Filogrupo (n° aislados)	Áreas (n° aislados)	Origen (n° aislados)	MLST (n° aislados)
Clínicas (n=42)	A (n=13)	Médica (n=4)	Orina (n=3)	CC10 (n=1; ST617), CC23 (n=2; 1 ST90, 1 ST88)
			Sangre (n=1)	CC168 (n=1; ST93)
		Extrahospitalarios (n=9) <sup>a</sup>	Orina (n=9)	CC10 (n=3; 2 ST617, 1 ST167), CC350 (n=1; ST350), CC155 (n=1; ST155), ST1014 (n=1)
	B1 (n=14)	Médica (n=3)	Orina (n=3)	ST359 (n=2)
		UCI (n=1)	Orina (n=1)	CC155 (n=1; ST1015)
		Quirúrgica (n=1)	Herida (n=1)	CC155 (n=1; ST1016)
		Extrahospitalarios (n=9)	Orina (n=9)	ST359 (n=5), CC155 (n=2; 1 ST58, 1 ST1017)
	D (n=15)	Médica (n=4)	Orina (n=4)	ST117 (n=1), fumC4 (n=1), fumC31 (n=2)
		UCI (n=1)	Orina (n=1)	
		Extrahospitalarios (n=10)	Orina (n=9)	CC31 (n=1; ST393), ST770 (n=1), ST1019 (n=1), fumC4 (n=2), fumC31 (n=1), fumC40 (n=1), fumC45 (n=2)
			Herida (n=1)	ST624 (n=1)
Fecales (n=19)	A (n=9)	Médica (n=1)		CC10 (n=1; ST10)
		Extrahospitalarios (n=8)		CC10 (n=6; 4 ST10, 1 ST48, 1 ST167), CC168 (n=1; ST93)
	B1 (n=4)	Médica (n=1)		
		Extrahospitalarios (n=3)		CC155 (n=1; ST1018)
	D (n=6)	Extrahospitalarios (n=6)		CC69 (n=1; ST106), CC59 (n=1; ST59), fumC31 (n=1), fumC32 (n=1), fumC39 (n=1), fumC40 (n=1)

**a.** Los pacientes extrahospitalarios incluyen aquellos procedentes de urgencias y de atención primaria. MLST: Multilocus Sequence Typing. ST: Secuencia Tipo. *fumC*: alelos correspondientes al gen de la fumarato hidratasa.

La mayoría de estos aislados procedía de individuos de la comunidad (n=40; 71,4%) incluyendo 2 voluntarios sanos, 3 convivientes de pacientes con infecciones urinarias y 35 pacientes ambulatorios. Los pacientes hospitalarios procedieron de Áreas Médicas (n=13; 23,2%), UCIs (n=2; 3,6%) y Quirúrgicas (n=1; 1,8%).

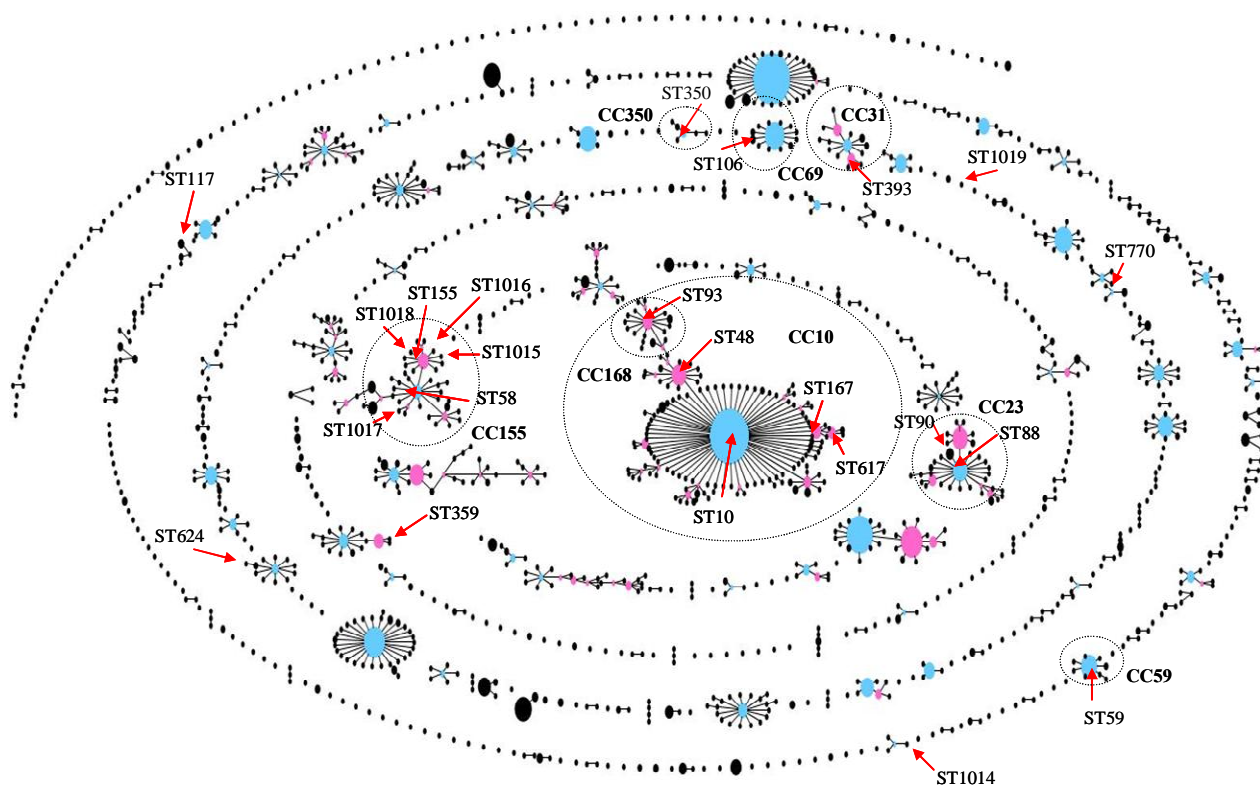
El origen de la muestras fue el siguiente: orinas (n= 39; 64,0%), heces (n=19; 31,1%), heridas (n=2; 3,3%), sangre (n=1; 1,6%).

### 3.2.2 Estructura poblacional

Los 61 aislados de *E. coli* estudiados se clasificaron en 60 pulsotipos distintos, correspondientes a los grupos filogenéticos A (36,1%; 22/61), D (34,4%; 21/61) y B1 (29,5%; 18/61). La mayoría de las cepas pertenecientes al filogrupo A se asignaron al complejo clonal ST10 (61,1%; 12/18); y esporádicamente a ST168 y ST23 (11,1%; 2/18, ambos). Los aislados del grupo B1 se clasificaron dentro de la secuencia tipo ST359 (58,3%; 7/12) y ST155 (50,0%; 6/12). El análisis de las secuencias del gen *fumC* de los aislados del filogrupo D mostró una gran diversidad (alelos 4, 31, 32, 39, 40, 45). Solamente una de las cepas estudiadas del grupo D perteneció al complejo clonal ST69 (ST106) (Tabla 22 y Figura 26).

### 3.2.3 Sensibilidad a antibióticos no beta-lactámicos

Los aislados de *E. coli* productores de CTX-M-14 presentaron altos porcentajes de resistencia al ácido nalidíxico, (73,8%; 45/61), tetraciclina (74,1%; 44/61), sulfonamidas (60,6%; 37/61), trimetoprim (59%; 36/61) y estreptomina (57,3%; 35/61), y de manera menos frecuente a cloranfenicol (36,1%; 22/61), ciprofloxacino (21,3%; 13/61), espectinomicina (19,7%; 12/61), tobramicina (9,8%; 6/61) gentamicina, ampicilina y apramicina (8,2% cada una; 5/61). Algunos aislados de los filogrupos A (n=6), B1 (n=5) y D (n=7) presentaron el perfil de multiresistencia ampicilina - cloranfenicol - estreptomina - sulfonamidas - tetraciclina - trimetoprim que se ha asociado recientemente con una isla genética que incluye genes de resistencia y factores de virulencia, presente en determinados clones uropatogénicos de *E. coli* (Lescat y cols., 2009). Es interesante reseñar que los aislados de los grupos A y D con este perfil también eran resistentes a fluoroquinolonas.



**Figura 26.** Representación mediante e-BURST de la estructura poblacional de *E. coli* productor de CTX-M-14 utilizando todas las ST incluidas en la base de datos de MLST de *E. coli*. Las ST caracterizadas en este estudio están señaladas con una flecha roja o dentro de un círculo. Los círculos azules representan a los fundadores de cada complejo clonal, los círculos rosa corresponden a los subgrupos de un fundador y los círculos negros al resto de singletons. La unión entre dos ST representa una única diferencia (single-locus) entre ellos. Este diagrama no representa la distancia genética entre ST no relacionadas y los complejos clonales.

### 3.2.4 Caracterización de los plásmidos

El gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> fue transferido por conjugación en el 75,4% de los aislados. Los plásmidos estudiados (n=39) se clasificaron en los grupos de incompatibilidad IncI y/o IncK (94,9%; 37/39) y en menor medida con el grupo IncHI2 (5,1%; 2/39).

#### Plásmidos del complejo IncI

Los 37 plásmidos caracterizados dentro del complejo IncI, se amplificaron con cebadores específicos del esquema de tipado de replicones por PCR tanto para el grupo IncI como IncK, e hibridaron con sondas específicas de las secuencias *inc* de estos grupos (Tabla 23). Veintisiete de estos plásmidos presentaron un tamaño similar (80-90 Kb) y se clasificaron en

cuatro tipos, en base al perfil de ADN digerido con *EcoRI*, *PstI* y *HpaI*. Tres de ellos (pRYC105, pRYC108 y pRYC109) presentaron un perfil muy similar con 1-3 bandas de diferencia. El análisis de las secuencias de ADN correspondientes a las moléculas de ARN antisentido implicadas en el control de la replicación, las replicasas y las relaxasas se muestran en las figuras 27-30.

El plásmido pRYC105 fue la variante predominante detectada desde el año 2000 al 2005 en pacientes hospitalarios, pacientes ambulatorios, y en voluntarios sanos. El análisis de secuencias obtenidas con los cebadores específicos de los plásmidos del grupo IncK de los plásmidos pRYC105, pRYC108 y pRYC109 mostraron homología con *inc\_R387*, RepA\_pSERB1/R387 y con NikB\_pSERB1 (GenBank M93063 y AY686591) y se clasificaron como plásmidos del grupo IncK. La región de replicación completa (1,2 Kb) que incluye los genes *inc*, *repY*, *repA/Z* y *ori*, se secuenció en distintos aislados con el plásmido pRYC105 y presentó una identidad a nivel de nucleótidos del 99,0% con R387. El análisis de las secuencias correspondientes a los amplicones obtenidos con los cebadores específicos de IncI, presentaron una identidad del 99-100% con las regiones ARNi de los plásmidos pTN38148, pSL476\_91, pCVM29188 (GenBank NC\_011514, NC\_011077 y CP01118, respectivamente) que pertenecen al grupo IncI. La hibridación de geles de ADN plasmídico digerido con *PstI* con sondas de productos de PCR de *inc\_R387*/ pSERB1 e *inc\_pSL476\_91* se produjo en una única banda. Aunque han sido documentadas hibridaciones cruzadas cuando se utilizan este tipo de sondas de IncK e IncI, en los casos analizados, la presencia de dos secuencias correspondientes a las regiones *inc* de los plásmidos de los grupos IncK (99,0% homología con R387) e IncI (99-100,0% homología con pTN38148, pSL476\_91 y pCMV29188) sugirió la existencia de dos secuencias *inc* próximas en el mismo plásmido.

El plásmido pRyC106, presentó un perfil de restricción de ADN distinto. El análisis de las secuencias obtenidas con los cebadores específicos de IncK e IncI, mostró una identidad del 100% con *inc\_pSL476\_91*, RepA\_ pSL476\_91 y NikB\_pSERB1 (GenBank CP001118, AY686591, respectivamente) y puede considerarse como un mosaico dentro del complejo IncI.

A diferencia del perfil de multiresistencia de las cepas salvajes, los transconjugantes correspondientes sólo presentaron resistencia a cefalosporinas (Tabla 23).



### Plásmidos del grupo IncHI2

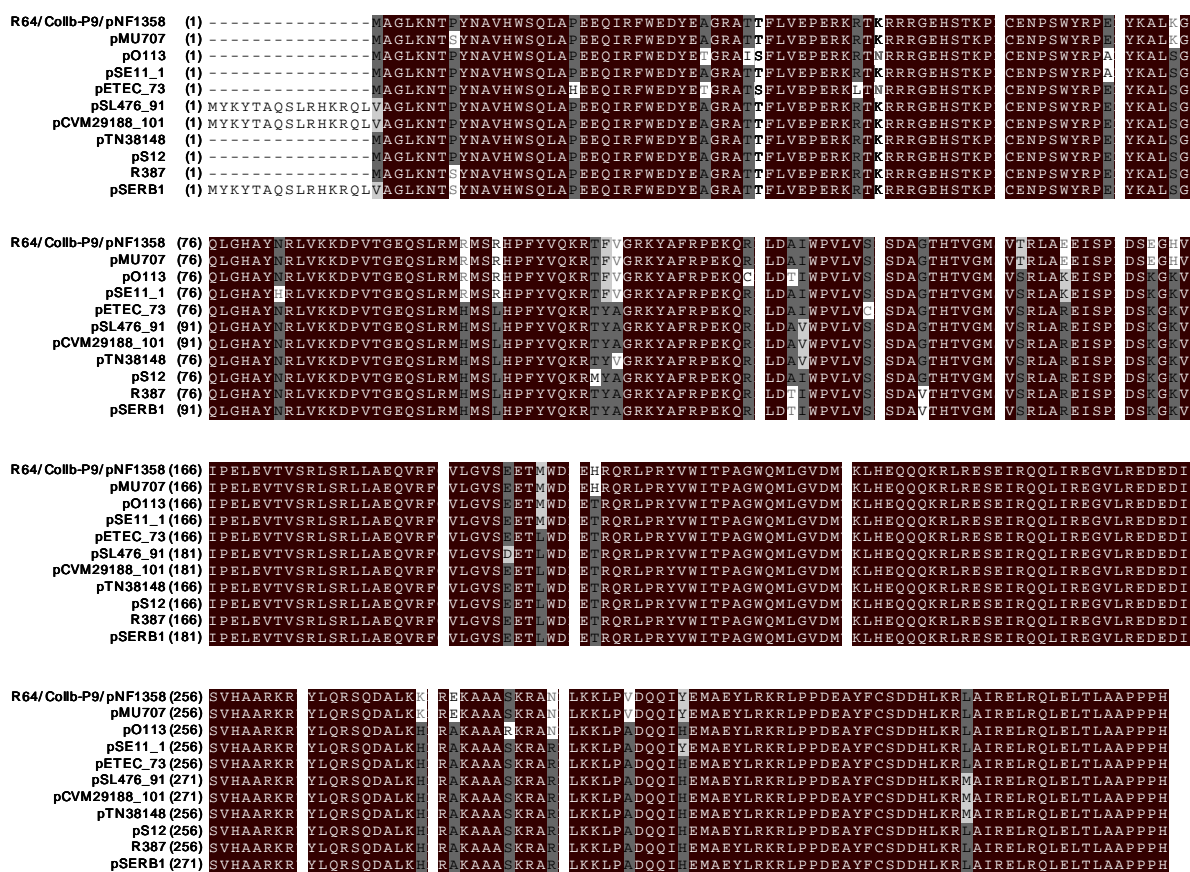
El gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> se localizó en un plásmido conjugativo de 290 Kb perteneciente al grupo IncHI2 en el 5,1% (2/39) de los plásmidos estudiados (Tabla 23). Las secuencias correspondientes al origen de replicación y a la relaxasa mostraron homología con R478, considerado el prototipo del grupo IncHI2 (GenBank BX664015.1).

Las secuencias correspondientes a los plásmidos descritos se asignaron con los siguientes números de acceso de GenBank: pRYC105, GQ892052; pRYC106, GQ892053; pRYC109, GQ892054 y pRYC110 GQ892051.

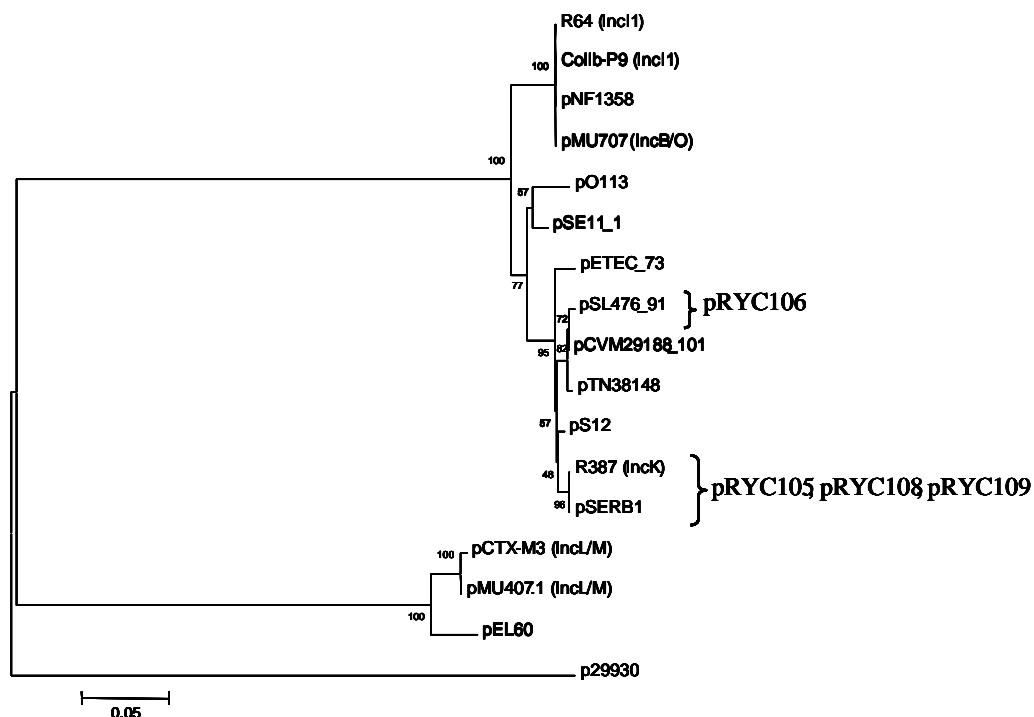
**Tabla 23.** Características de los plásmidos que contienen *bla*<sub>CTX-M-14</sub>.

Grupo Inc	Patrón restricción <sup>a</sup>	Nº aislados	Filogrupo (nº aislados)	Fecha	Resultados PCR replicones <sup>b</sup>	Tamaño Plásmido (kb)	Variante <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> (nº aislados)	Entorno genético (nº aislados)	Resistencias asociadas <sup>e</sup>
IncK	pRYC105	24	A (10)	2001-05	II, K <sup>c</sup> , (B/O) <sup>d</sup>	80	a (10)	ISECpl (10)	(Sm, Gm, Km, Ap, Ne, Na, Cp, Su, Tp, Te, Cl) <sup>f</sup>
			B1 (7)	2002-05	II, K	80	a (7)	ISECpl (7)	(Sp, Gm, Km, Tb, Ak, Ap, Ne, Su, Tp, Cl)
			D (8)	2002-05	II, K	80	a (8)	ISECpl (8)	(Sm, Sp, Nm, Ne, Na, Cp, Su, Tp, Te, Cl)
IncK	pRYC108	1	A (1)	2002	II, K	80	a (1)	ISECpl (1)	Na, Te
IncK	pRYC109	1	D (1)	2004	II, K	80	b (1)	ISECpl (1)	Sm, Sp, Na, Cp, Su, Tp, Te, Cl
IncI1	pRYC106	1	D (1)	2003	II, B/O	80	a (1)	ISECpl (1)	Sm, Su, Nm, Cp, Tp, Te
IncI1	ND	2	A (2)	2005	II	60-90	a (2)	ISECpl (1), ISCRI (1)	(Sm, Sp, Cp, Su, Te, Cl), Tp
IncI1	ND	4	B1 (4)	2002-05	II	60-80	a (4)	ISECpl (4)	(Sm, Sp, Gm, Km, Ak, Ap, Ne, Su, Tp, Te, Cl)
IncI1	ND	4	D (4)	2004	II	70-75	a (4)	ISECpl (2), ISCRI (2)	(Sm, Sp, Km, Cp, Su, Tp, Te, Cl)
IncHI2	pRYC110	2	D (2)	2002-03	HI2	240	a (n=1), b (n=1)	ISCRI (2)	(Sp, Na, Su, Tp, Cl), Sm, Te

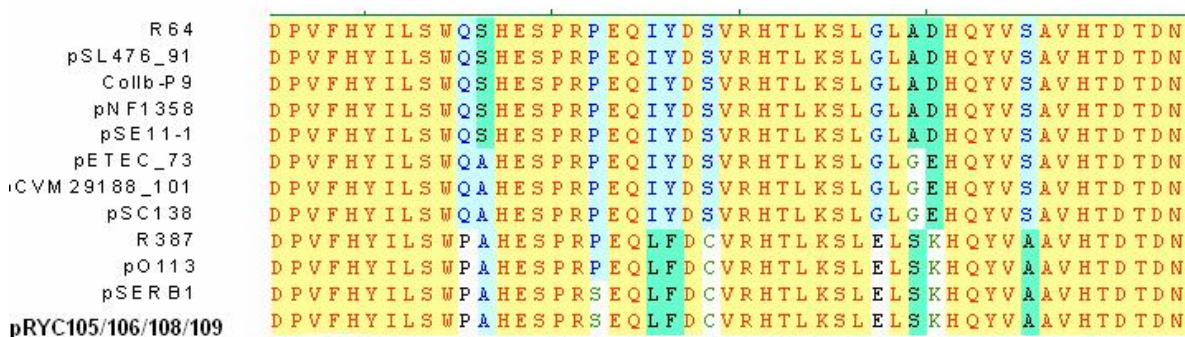
**a.** El tipo de plásmido se determinó por digestión de ADN plasmídico con distintas enzimas de restricción; ND: no determinado (corresponde a aquellos aislados en los que no se obtuvo transconjugante, el tipo de replicón fue identificado mediante hibridación utilizando sondas específicas). **b.** El tipo de replicón se identificó por PCR y secuenciación. **c.** Tipos de replicón confirmados por hibridación aparecen subrayados. **d.** Entre paréntesis se muestran algunos aislados que amplificaron con los cebadores específicos del grupo IncB/O. **e.** Los aislados con sensibilidad intermedia se consideran resistentes **f.** Las resistencias a los antibióticos entre paréntesis indican sensibilidad variable a ese antibiótico. Ak, amicacina; Ap, apramicina; Cl, cloranfenicol; Cp, ciprofloxacino; Gm, gentamicina; Km, kanamicina; Na, ácido nalidíxico; Ne, netilmicina; Nm, neomicina; Sm, estreptomina; Sp, espectinomicina; Su, sulfonamidas; Tb, tobramicina; Te, tetraciclina; Tp, trimetoprim.



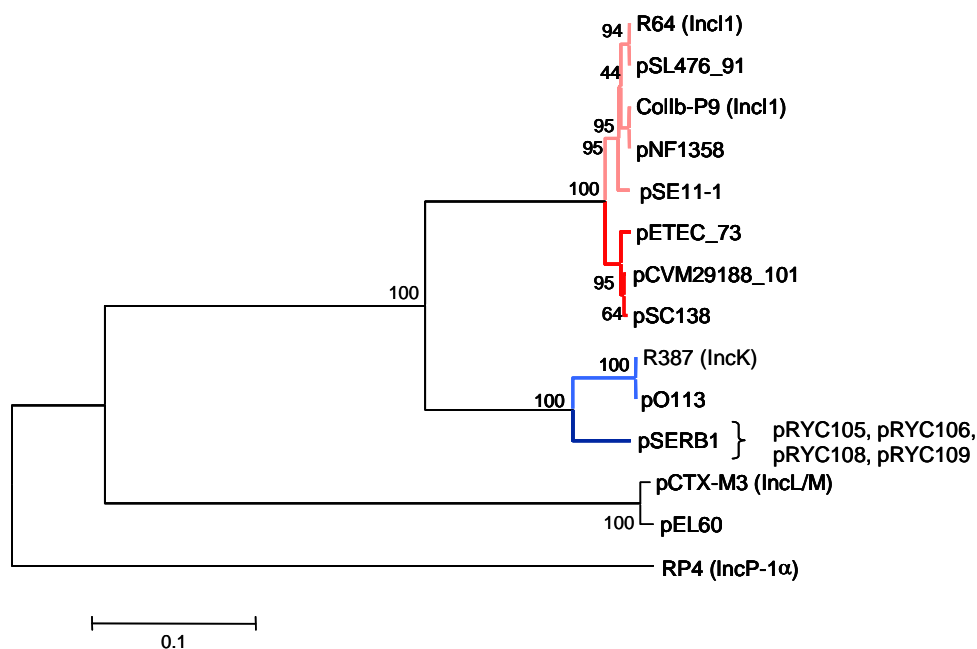
**Figura 27.** Alineamiento de las secuencias de proteínas de replicación de los plásmidos IncI e IncK. Leyenda de colores: blanco sobre negro, aminoácidos invariantes; negro sobre gris oscuro, aminoácidos muy conservados; negro sobre gris claro, aminoácidos similares; gris sobre blanco, aminoácidos poco similares.



**Figura 28.** Filogenia de las replicasas de los plásmidos IncII e IncK. El árbol se construyó utilizando el programa MEGA versión 3.1 (Kumar y cols., 2004) a partir del alineamiento múltiple de las secuencias de las replicasas por el método neighbour-joining, usando el modelo p-distance con delección completa, y comprobado por medio de los valores de bootstrap obtenidos a partir de 1000 réplicas. La replicasa del plásmido p29930 fue utilizada para enraizar el árbol. Las replicasas de los plásmidos pRYC105, pRYC106, pRYC108 y pRYC109 se agrupan con aquellas con las que presentan un 100% de homología mediante llaves. N° acceso GenBank de las replicasas incluidas en el análisis: R64 (NP\_863360), ColIb-P9 (NP\_052449), pNF1358 (AAZ05341), pMU707 (AAA98176), pO113 (YP\_308827), pSE11-1 (YP\_002296026), pETEC\_73 (YP\_001451513), pSL476\_91 (YP\_002043842), pCVM29188\_101 (YP\_002039041), pTN38148 (YP\_002302249), pS12 (BAD72945), pSERB1 (AAT94184), pCTX-M3 (NP\_775034), pMU407.1 (AAA87028), pEL60 (NP\_943262), p29930 (CAD58558).



**Figura 29.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las relaxasas de los grupos IncI e IncK en relación con los plásmidos de CTX-M-14. Colores del alineamiento: rojo sobre amarillo, aminoácidos invariantes; azul oscuro sobre azul claro, aminoácidos muy conservados; negro sobre verde, aminoácidos similares; verde y negro sobre blanco, aminoácidos poco similares.



**Figura 30.** Filogenia de las relaxasas de los plásmidos IncI e IncK del grupo MOB12. Esta figura contiene una vista expandida del clado MOB12 (Garcillán-Barcia y cols., 2009). Árbol realizado por el método neighbour-joining utilizando análisis pareado y comprobado por medio de los valores de bootstrap obtenidos a partir de 1000 réplicas. El árbol fue construido utilizando el programa MEGA versión 3.1 (Kumar y cols., 2004) a partir del alineamiento múltiple de los 300 aminoácidos del extremo N-terminal de las relaxasas de varios plásmidos IncI, IncK y IncL/M. La relaxasa TraI del plásmido RP4 IncP1- $\alpha$  fue utilizada para enraizar el árbol. Las ramas de tonos rojos corresponden a las relaxasas de plásmidos IncI y las de tonos azules a plásmidos IncK. Las relaxasas amplificadas de los plásmidos pRYC105, pRYC106, pRYC108 y pRYC109 se agrupan con aquellas con las que presentan un 100% homología mediante llaves. N° acceso GenBank de las relaxasas de los plásmidos utilizados en la filogenia: R64 (BAA78021), pSL476\_91 (YP\_002043909), Collb-P9 (NP\_052501), pNF1358 (AAZ05365), pSE11-1 (BAG80277), pETEC\_73 (YP\_001451521), pCVM29188\_101 (YP\_002039113), pSC138 (YP\_209402), pO113 (YP\_308733), pSERB1 (AAT94234), pCTX-M3 (AAN87675), pEL60 (NP\_943241), RP4 (CAA38336).

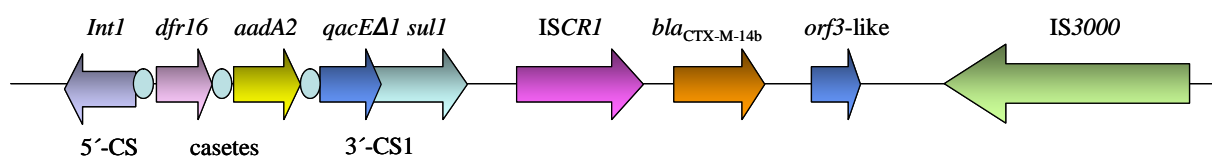
### 3.2.5 Diversidad de las secuencias y plataformas genéticas del gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub>

El análisis de las secuencias del gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> permitió identificar variantes designadas previamente como “a” (n=59/61) y “b” (n=2/61) (GenBank AF252622 y DQ359215, respectivamente). La variante predominante es *bla*<sub>CTX-M-14a</sub> y codifica la enzima considerada como el progenitor de la familia CTX-M-9, también descrita como CTX-M-18 (Barlow y cols., 2008). La variante *bla*<sub>CTX-M-14b</sub> ha sido sólo identificada en España y Túnez (Navarro y cols., 2007a, Vinué y cols., 2009; GenBank EU274579). Presenta tres cambios de nucleótidos (A372G, G570A, G702A) en relación a *bla*<sub>CTX-M-14a</sub>, encontrándose los dos últimos cambios también en *bla*<sub>CTX-M-9</sub>. La variante *bla*<sub>CTX-M-14a</sub> se asoció tanto a *ISECp1* en plásmidos IncK (n=27), como a *ISCR1* localizado en plásmidos IncHI2 (n=1) y en plásmidos IncI (n=3). La variante *bla*<sub>CTX-M-14b</sub> se localizó junto a *ISCR1* en un plásmido IncHI2 (n=1) e *ISECp1* en un plásmido IncK (pRYC109; n=1) (Tabla 22).

La distancia intergénica entre el gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> e *ISECp1* fue de 42 pb, en ambas variantes, al igual que sucede con otros genes *bla*<sub>BLEE</sub> pertenecientes a la familia de CTX-M-9, como *bla*<sub>CTX-M-9,-14,-16,-17,-19,-21,-24</sub> y *bla*<sub>Toho-2</sub> (GenBank AF174129, AAF72530, AY033516, AF454633, AF458080, AJ416346, NC\_011617 y D89862; respectivamente).

En algunos aislados representativos de cada tipo de plásmido también se describió la presencia de IS903 truncada corriente abajo de las secuencias *ISECp1-bla*<sub>CTX-M-14</sub>.

En los cinco aislados asociados en los que se identificó la secuencia *ISCR1-bla*<sub>CTX-M-14a</sub> (n=3) e *ISCR1-bla*<sub>CTX-M-14b</sub> (n=2), éstas se localizaron en un derivado defectivo de Tn402, similar a In60 asociado a *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (GenBank AF171429). En nuestro caso, la asociación de In60 a Tn21 no pudo ser establecida (Figura 31).



**Figura 31.** Estructura de In60 que contiene al gen *bla*<sub>CTX-M-14b</sub>.

### 3.3 SHV-12

#### 3.3.1 Aislados, pacientes y origen de las muestras

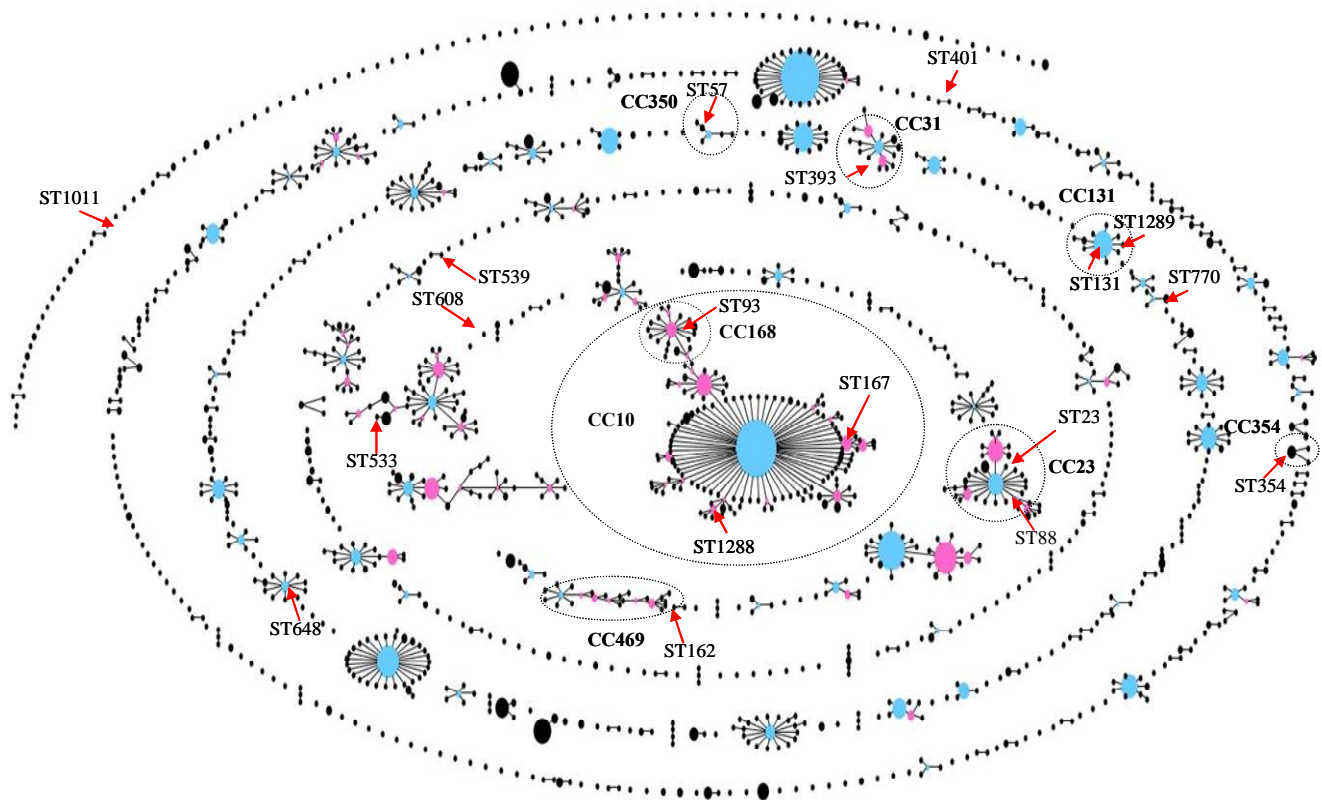
En el estudio se incluyeron 49 aislados productores de SHV-12, obtenidos de 48 individuos desde 1999 hasta 2005 que incluían pacientes comunitarios (n=23; 46,9%) y pacientes hospitalizados en Áreas Médicas (n=14; 28,6%), Quirúrgicas (n=6; 12,2%) y UCIs (n=4; 8,2%). El origen de las muestras fue el siguiente: orinas (n=16; 33,0%), heces (n=12; 25%), heridas (n=5; 10,0%), catéter y muestras respiratorias (n=2 cada uno; 4,0%), bilis, broncoaspirado, sangre, biopsia, exudado, orgánica, respiratoria (n=1 cada uno; 2,0%). También se estudió un aislado procedente de una muestra de alimentos y otro de agua de un lago.

#### 3.3.2. Estructura poblacional

Los 49 aislados fueron identificados como *E. coli* (n=33) y *K. pneumoniae* (n=16). El análisis por PFGE de los aislados de *E. coli* mostró una gran diversidad (33 aislados/29 pulsotipos), mientras que la mayoría de los aislados de *K. pneumoniae* (75,0%; 12/16) pertenecían al mismo clon (Kp49S), detectado desde 2001 a 2003 en diferentes áreas del hospital.

Los aislados de *E. coli* correspondieron a los grupos filogenéticos D (42,4%; 14/33), A (36,4%; 12/33), and B1 (21,2%; 7/33). Los aislados del filogrupo A pertenecieron en su mayoría al complejo clonal ST23 (4/9; 44,4%) y en menor medida al complejo clonal ST10 (2/9; 22,2%). Los aislados del grupo B1 y D correspondieron con una gran variedad de STs y complejos clonales, sin que ninguno de ellos fuera predominante (Figura 32, Tabla 24).

Todos los aislados de *K. pneumoniae* productores de SHV-12 se clasificaron dentro del grupo filogenético KpI. El análisis por MLST, mostró una gran variabilidad de STs, algunas de ellas no descritas anteriormente (ST346, ST370, ST385) (Figura 23, Tabla 21).



**Figura 32.** Representación mediante e-BURST de la estructura poblacional de *E. coli* productor de SHV-12 utilizando todas las ST incluidas en la base de datos de MLST de *E. coli*. Las ST caracterizadas en este estudio están señaladas con una flecha roja o dentro de un círculo. Los círculos azules representan a los fundadores de cada complejo clonal, los círculos rosa corresponden a los subgrupos de un fundador y los círculos negros al resto de singletons. La unión entre dos ST representa una única diferencia (single-locus) entre ellos. Este diagrama no representa la distancia entre ST no relacionadas y los complejos clonales.



**Tabla 24.** Características epidemiológicas de los aislados productores de SHV-12 identificados entre 1999 y 2005.

Especie (n° aislados)	Muestras (n° aislados)	Filogrupo (n° aislados)	Áreas (n° aislados)	Origen (n° aislados)	MLST (n° aislados)
<i>E. coli</i> (n=33)	Ambientales (n=2)	A (n=1)		Agua (n=1)	ST608 (n=1)
		D (n=1)		Alimentos (n=1)	ST1011 (n=1)
	Clínicas (n=19)	A (n=7)	Extrahospitalarios (n=5) <sup>a</sup>	Orina (n=4)	CC23 (n=1; ST23), CC168 (n=1; ST93), CC10 (n=1; ST167)
			Quirúrgica (n=2)	Exudado (n=1)	CC10 (n=1; ST167)
				Líquido orgánico (n=1)	CC10 (n=1; ST167)
				Herida (n=1)	CC10 (n=1; ST1288)
		B1 (n=5)	Médica (n=3)	Respiratoria (n=1)	ST539 (n=1)
				Biopsia (n=1)	CC469 (n=1; ST162)
		D (n=7)	Extrahospitalarios (n=2)	Orina (n=1)	ST533 (n=1)
			Médica (n=1)	Orina (n=2)	
	Fecales (n=12)	A (n=4)	Extrahospitalarios (n=5)	Orina (n=1)	ST1011 (n=1)
				Orina (5)	ST648 (n=2) <sup>b</sup> , CC131 (n=1; ST1289), CC350 (n=1; ST57), CC354 (n=1; ST354)
		B1 (n=2)	UVI (n=1)	Torunda rectal (1)	
			Médica (n=1)		CC23 (n=1; ST88)
		D (n=6)	Extrahospitalarios (n=5)		CC23 (n=1; ST88, n=1; ST23)
			Médica (n=1)		
					ST770 (n=1), ST401 (n=1), CC131 (n=1; ST131), CC31 (n=1; ST393), ST648 (n=2) <sup>b</sup>

Tabla 24. Continuación

Especie (n° aislados)	Muestras (n° aislados)	Filogrupo (n° aislados)	Áreas(n° aislados)	Origen (n° aislados)	MLST (n° aislados)
<i>K. pneumoniae</i> (n=16)	Clínicas (n=16)	KpI (n=16)	Médica (n=8)	Orina (n=1), Catéter (n=2), Herida (n=2),	ST37 (n=1), ST346 (n=1), ST385 (n=6) <sup>c</sup>
			UVI (n=5)	Sangre (n=1),	ST39 (n=1), ST385 (n=4) <sup>c</sup>
			Quirúrgica (n=2)	Broncoaspirado (n=1),	ST370 (n=1), ST385 (n=1) <sup>c</sup>
			Extrahospitalarios (n=1) <sup>a</sup>	Bilis (n=1) Torunda rectal (n=2), Orina (n=1)	ST14 (n=1)

**a.** Los pacientes extrahospitalarios incluyen aquellos procedentes de urgencias y de atención primaria MLST: Multilocus sequence typing. ST: secuencia tipo. **b.** Estos aislados de *E. coli* presentaron el mismo pulstipo. **c.** Estos aislados de *K. pneumoniae* presentaron el mismo pulstipo.

### 3.3.3 Sensibilidad a antibióticos no beta-lactámicos

Los aislados productores de SHV-12 fueron resistentes a sulfonamidas (89,4%; 42/47), trimetoprim (70,2%, 33/47), tetraciclina (61,7%, 26/47), estreptomicina (53,2%, 25/47), ácido nalidíxico (52,1%; 24/47), cloranfenicol (44,7%; 21/47) y de manera menos frecuente a espectinomicina (38,4%; 18/47), ciprofloxacino (23,4%; 11/47), kanamicina (19,2%; 9/47), tobramicina (10,6%; 5/47), gentamicina y ampicacina (8,5% cada uno; 4/47), y apramicina (6,4%; 3/47).

### 3.3.4 Caracterización de los plásmidos

El gen *bla*<sub>SHV-12</sub> fue transferido por conjugación en el 91,2% (45/49) de los aislados. Se caracterizaron 37 plásmidos que se clasificaron en los grupos IncI (46%; 17/37), IncN (8,1%; 3/37), IncFIB (8,1%; 3/37) e IncA/C (2,7%; 1/37). Trece plásmidos (35,1%; 13/37) se clasificaron como cointegrados de los grupos IncI e IncN (Tabla 25).

Los plásmidos IncI mostraron un tamaño variable (desde 80 a 100 Kb) y se describieron principalmente en los años 2003-2004 en pacientes de la comunidad o en las muestras de aguas y alimentos (70,6%; 12/17). No se encontró ningún patrón de restricción mayoritario. El análisis de la secuencia de la región de replicación completa de los plásmidos IncI1, mostró una identidad de nucleótidos del 100,0% con la del plásmido pSL476\_91 (GenBank YP\_002043842) en 4 de los plásmidos, del 99,0% con la del plásmido pCVM29188\_101 (GenBank YP\_002039041) en seis plásmidos y del 99,0% con la del plásmido pTN38148 (GenBank YP\_002302249) en 2 plásmidos.

Los plásmidos IncN presentaron un tamaño de 40 Kb, y en ninguno de los casos se pudo determinar su perfil de restricción. Se encontraron en aislados hospitalarios recogidos en desde el año 1999 al 2001. Se caracterizaron cointegrados de los grupos IncI e IncN de 40 y 60 Kb. Los plásmidos de 40 Kb, que presentaron el mismo perfil de restricción, se obtuvieron de aislados de *E. coli* y de *K. pneumoniae* de distintos orígenes (2003-2004).

Los plásmidos FIB de 145-150 Kb se localizaron en aislados de distintos orígenes en 2001 y 2002.

El plásmido IncA/C de 50 Kb se caracterizó en un aislado de *E. coli* procedente de un paciente comunitario del año 2000.

**Tabla 25.** Características de los plásmidos que contienen *bla<sub>SHV-12</sub>*.

Grupo	Patrón de restricción <sup>b</sup>	Nº aislados	Filogrupo	Fecha	Contenido total de replicones por PCR <sup>c</sup>	Tamaño plásmido (Kb)	Resistencias asociadas <sup>e</sup>
Inc			<i>E. coli</i> / <i>K. pneumoniae</i>				
Incl1, IncK	pRYC111	1	A	2002	<u>II</u>	102	Sp, Sm, Na, Su, Tp, Te, Cl
Incl1	pRYC112	1	A	2002	<u>II</u>	100	<u>Sp</u> , Sm, Na, <u>Su</u> , Tp, Te, Cl
Incl1	pRYC113	1	A	2003	<u>II</u> , B/O, F, FIA, FIB, N, P, A/C	100	Na, <u>Cp</u> , <u>Su</u> , Te, Cl
Incl1	pRYC114	2	A	2003-04	<u>II</u> , P, (F, FIA)	100	<u>Te</u> , <u>Su</u> <sup>g</sup> , (Cl) <sup>h</sup>
Incl1	pRYC115	1	A	2004	<u>II</u> <sup>d</sup> , K	100	Sm, Sp, Na, <u>Su</u> <sup>f</sup> , Tp, Te, Cl
Incl1	pRYC116	1	A	2004	<u>II</u> , F, FIA, FIB, Y	100	Sm, Sp, Na, <u>Su</u> , Te, Cl
Incl1	ND	1	B1	2004	<u>II</u>	100	Sm, Sp, Cp, Na, Su, Tp, Te, Cl
Incl1	ND	1	B1	2004	<u>II</u>	100	Sm, Sp, Su, Tp, Te, Cl
Incl1	ND	1	B1	2004	<u>II</u>	100	Sm, Sp, Su, Tp, Te, Cl
Incl1	pRYC117	3	D	2003	<u>II</u> , (K, Y)	100	(Na), <u>Su</u> <sup>g</sup> , Cl
Incl1	ND	1	D	2004	<u>II</u> , K	100	Sm, Cp, <u>Su</u> , Tp, Te
Incl1	pRYC118	1	KpI	2004	<u>II</u>	80	Nm, Km, Su, Te
Incl1	pRYC119	1	KpI	2004	<u>II</u> , K, B/O, N, FII, FIA, P	80	~
Incl1 <sup>a</sup> IncFIB <sup>a</sup>	ND	1	D	2002	<u>II</u> , B/O, F, FIB <u>II</u> , B/O, F, FIB	<u>102</u> <u>153</u>	<u>Sp</u> , Sm, Ap, <u>Su</u> , Tp, Te, Cl

Tabla 25. Continuación

Grupo	Patrón de restricción <sup>b</sup>	Nº aislados	Filogrupo	Fecha	Contenido total de replicones por PCR <sup>c</sup>	Tamaño plásmido (kb)	Resistencias asociadas <sup>d</sup>
Inc			<i>E. coli</i> / <i>K. pneumoniae</i>				
IncI1, IncN	pRYC120	11	Kpl	01-03	<u>II</u> , <u>N</u> , K, A/C	60	Su, <u>Tp</u> <sup>f</sup>
IncI1, IncN	pRYC121	1	Kpl	2003	<u>II</u> , <u>N</u> , F, FIA, A/C	40	Sm, Sp, Su
IncI1, IncN	pRYC121	1	D	2004	<u>II</u> , <u>N</u> <sup>d</sup> , FII, FIA, FIB, P	40	~
IncN	ND	1	A	2001	<u>N</u>	40	Sm, <u>Te</u>
IncN	ND	1	B1	1999	<u>II</u> , <u>N</u>	40	Sm, <u>Km</u> , Su, Tp
IncN	ND	1	D	2000	<u>N</u> , F, FIB	40	Sm, Sp, Na, Cp, Te
IncA/C	pRYC122	1	D	2000	<u>II</u> , <u>N</u> , F, FIB, P, <u>A/C</u>	50	Sm, Sp, Km, Ap, Ne, Nm, Na, Cp, Su, Tp, Te, Cl,
IncFIB	pRYC123	2	A	2001-02	<u>II</u> , F, FIA, <u>FIB</u> , (P, B/O)	145	Sm, Gm, Ak, Ne, Na, <u>Cl</u> , (Sp, <u>Km</u> , <u>Tb</u> , <u>Su</u> , <u>Tp</u> , <u>Te</u> ) <sup>h</sup>

**a.** Plásmidos detectados en el mismo aislado. **b.** El tipo de plásmido se determinó por digestión de ADN plasmídico con distintas enzimas de restricción; ND: no determinado (corresponde a aislados dónde no se obtuvo transconjugante o el ADN plasmídico se degradó. El tipo de replicón fue identificado mediante hibridación utilizando sondas específicas). **c.** El tipo de replicón se identificó por PCR y secuenciación. **d.** Los tipos de replicón confirmados por hibridación aparecen subrayados **e.** Los aislados con sensibilidad intermedia se consideran resistentes. **f.** Las resistencias que aparecen subrayadas indican transferencia de la misma por conjugación. **g.** La transferencia de la resistencia a sulfonamidas fue variable. **h.** Las resistencias a los antibióticos entre paréntesis indican sensibilidad variable a ese antibiótico. (~) aislados sensibles a todos los antibióticos estudiados. Ap, apramicina; Cl, cloranfenicol; Cp, ciprofloxacino; Gm, gentamicina; Km, kanamicina; Na, ácido nalidíxico; Ne, netilmicina; Nm, neomicina; Sm, estreptomina; Sp, espectinomina; Su, sulfonamidas; Tb, tobramicina; Te, tetraciclina; Tp, trimetoprim.

## **DISCUSIÓN**



El descubrimiento de los antibióticos constituyó un hito en el desarrollo de la medicina, pero a medida que se generalizó su uso, las bacterias han ido generando mecanismos de resistencia a todos las familias de agentes antimicrobianos disponibles, constituyendo en la actualidad un grave problema de Salud Pública (World Health Organization, 2002).

Las BLEE confieren resistencia a antibióticos de primera elección y desde su detección inicial en el año 1983 (Knothe y cols., 1983), ya se consideraron como un importante problema a nivel hospitalario. Fue en este ámbito dónde se desarrollaron los primeros trabajos para conocer su epidemiología. En aquellos años, las cefalosporinas de amplio espectro hidrolizadas por estas enzimas suponían los últimos recursos en cuanto a opciones terapéuticas de antibióticos beta-lactámicos. Dos años más tarde se pudo disponer de las carbapenemas como alternativa.

Los primeros aislados productores de BLEE estaban asociados a *K. pneumoniae* causante de brotes nosocomiales, en su mayoría en UCIs y que producían enzimas de tipo TEM y SHV (Paterson y cols., 2005; Peña y cols., 2001). En la actualidad son más prevalentes los aislados de *E. coli* procedentes de pacientes de la comunidad, sobre todo los productores de enzimas de tipo CTX-M (Cantón y cols., 2006). El éxito en la diseminación de estos aislados es un hecho multifactorial en el que se encuentran implicados no sólo la dispersión clonal sino también los elementos genéticos (integrones, transposones, plásmidos) a los que se asocian los genes *bla*<sub>BLEE</sub>.

La presencia de portadores sanos de enterobacterias productoras de BLEE se ha puesto de manifiesto en los últimos años en diversos estudios dónde se analiza su prevalencia. Estos trabajos se han realizado tanto en individuos que han tenido contacto con el medio hospitalario como en aquellos carentes de este nexo epidemiológico (Ben-Ami y cols., 2006; Castillo y cols., 2007; Miró y cols., 2005; Pallecchi y cols., 2007; Vinué y cols., 2009) mostrando en algunos de estos estudios un aumento en el porcentaje de portadores a lo largo del tiempo (Castillo y cols., 2007; Pallecchi y cols., 2007). La existencia de portadores de microorganismos productores de BLEE aumenta la complejidad del problema, puesto que podrían representar no sólo un reservorio para este tipo de aislados facilitando así su diseminación, y constituir un factor de riesgo de padecer infecciones por este tipo de aislados, sobre todo cuando se produce el ingreso hospitalario (Ben-Ami y cols., 2006).



En esta Tesis se estudian aspectos epidemiológicos de los aislados productores de BLEE en la comunidad (estudio de portadores fecales, voluntarios sanos, convivientes y muestras ambientales) y de aislados clínicos de *K. pneumoniae* tanto en el ámbito hospitalario como en el extrahospitalario. Este microorganismo se ha considerado como un reservorio de genes productores de estas enzimas, siendo particularmente útil para monitorizar los posibles cambios epidemiológicos. También se analizan aspectos de la epidemiología molecular de distintas BLEE (CTX-M-2, CTX-M-14, SHV-12) con el objetivo de conocer los posibles factores implicados en su persistencia y diseminación.

## 1. AISLADOS PRODUCTORES DE BLEE EN LA COMUNIDAD Y EN EL HOSPITAL

Desde su primera descripción en nuestro hospital en 1988 (Baquero y cols., 1988), se ha realizado un seguimiento continuo de los aislados productores de BLEE. Al igual que ha ocurrido en otros hospitales, los estudios de portadores fecales de bacterias productoras de esta enzimas sólo se realizaron en el contexto de vigilancia epidemiológica de brotes y de seguimiento de bacterias multirresistentes.

En el año 1991 se realizó un estudio de portadores fecales en una situación de aparente ausencia de brote (Cantón, Tesis Doctoral, 1994; Valverde y cols., 2004). En este trabajo se incluyeron las muestras enviadas al Laboratorio de Microbiología para la caracterización rutinaria de enteropatógenos. En los años 2003 y 2007, se realizaron estudios siguiendo la misma metodología que mostraron un aumento global en la prevalencia de portadores fecales (0,6%, 7,0% y 8,2%, respectivamente), siendo más notable en sujetos procedentes de la comunidad (0,7%, 5,5% y 7,9%) que en pacientes ingresados en el hospital (0,3%, 11,8% y 8,9%) (Valverde y cols., 2004; Paniagua y cols., 2010). Estos resultados son similares a los de otros estudios de portadores realizados en hospitales de nuestro país. En un trabajo realizado en Barcelona por Miró y cols. en 2002 la incidencia de portadores fecales en pacientes extrahospitalarios fue del 7,5% (Miró y cols., 2005). En otro estudio llevado a cabo en 2002 y 2004 en Zaragoza, Castillo y cols. mostraron un aumento en la prevalencia de portadores desde un 2,3% en 2002 a un 7,4% en 2004. En este trabajo, los porcentajes de pacientes comunitarios portadores de aislados productores de BLEE también aumentaron significativamente de un 2,1% a un 7,2% (Castillo y cols., 2007). El aumento en la prevalencia de los portadores de enterobacterias con BLEE reafirma la importancia del compartimento intestinal como reservorio para este tipo de microorganismos.

En nuestro trabajo, las cifras de colonización descritas para pacientes hospitalarios son mayores que en los pacientes ambulatorios. Castillo y cols. también describen porcentajes de colonización de pacientes hospitalarios superiores a las de los individuos de la comunidad (2,5% vs 2,3% en 2002 y 8,2% vs 7,2% en 2004) (Castillo y cols., 2007). El hecho de que en los hospitales exista una mayor presión antibiótica facilitaría la selección de microorganismos productores de BLEE y que por tanto exista un mayor porcentaje de individuos colonizados en el hospital que en la comunidad. Asimismo, en este contexto es más fácil que se produzcan procesos de transmisión de estos microorganismos entre diferentes pacientes.

Las cifras de colonización de los voluntarios sanos incluidos en el estudio de 2003 fueron menores que las de los pacientes comunitarios (3,7% vs 5,5%). Este dato es menor que el descrito por Vinué y cols. en 105 muestras de heces de voluntarios sanos recogidas en 2007 en Madrid y La Rioja donde la tasa de colonización llega al 6,6%. (Vinué y cols., 2009) Woerther y cols describen en una aldea de la Guayana Francesa un incremento en el porcentaje de colonización en voluntarios sanos desde el 3,2% en 2001 hasta el 8,0% en 2006 (Woerther y cols., 2010). Otros estudios reflejan un menor índice de colonización en este tipo de individuos. En niños en Latinoamérica sin contacto con el medio hospitalario, la tasa de colonización fue del 0,1% en 2002 y se incrementó hasta el 1,7% en 2005 (Pallecchi y cols., 2007). Estas cifras fueron más elevadas en trabajadores sanitarios (3,4%) y estudiantes (2,4%) en el Líbano (Moubareck y cols., 2005). En otro trabajo llevado a cabo en Arabia Saudí por Kader y cols. (Kader y cols., 2007), los porcentajes de colonización son más elevadas tanto en el caso de pacientes como en voluntarios sanos (26,1% de los pacientes hospitalarios, 15,4% de los extrahospitalarios y 13,1% de los voluntarios sanos).

La presencia de portadores fecales de enterobacterias productoras de BLEE en la comunidad y su posible papel como reservorio de estos aislados podrían favorecer su diseminación en el hospital, dónde la presión antibiótica es mayor que en el ámbito comunitario. No obstante, la utilización de antibióticos en la comunidad que son hidrolizados por las BLEE, como por ejemplo cefuroxima y otras cefalosporinas orales de espectro reducido y de antibióticos no beta-lactámicos como las fluoroquinolonas, podrían haber ejercido un efecto de selección de estos aislados en el ámbito comunitario. En este sentido distintos autores señalan el consumo de antibióticos como un factor de riesgo para la adquisición de infecciones por aislados con BLEE (Ben-Ami y cols., 2009; García San Miguel y cols., 2007; Rodríguez-Baño y cols., 2010).

El flujo entre los aislados productores de BLEE procedentes de la comunidad y el hospital queda patente en distintos estudios. En el trabajo realizado por Oteo y cols. en hospitales, residencias de ancianos o en instituciones de atención comunitaria se detecta la presencia de un grupo clonal presente tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad (Oteo y cols., 2006). Ben-Ami y cols. estudiaron en Israel la prevalencia de portadores fecales antes del ingreso en el hospital, alcanzándose unas tasas de colonización del 10,8%. Estos pacientes procedían de su domicilio o de instituciones de larga estancia. De ellos un 15,4% tuvo bacteriemia por los mismos microorganismos productores de BLEE por los que estaba

previamente colonizado (Ben-Ami y cols., 2006). Este hecho demuestra en parte la importancia de la colonización fecal para la infección posterior por estos microorganismos. Otro estudio similar realizado en otro centro hospitalario del mismo país, reveló que el porcentaje de portadores de BLEE en su ingreso es del 8,0% (13/167). De estos pacientes, 12 permanecieron ingresados en el hospital dos semanas después y el 33,0% (4/12) continuó colonizado por microorganismos productores de BLEE (Friedmann y cols., 2009).

La infección o colonización por microorganismos productores de BLEE no es un hecho que se produzca exclusivamente a nivel nosocomial, como lo demuestran distintos estudios realizados en individuos procedentes de la comunidad o de centros de larga estancia, que podrían actuar como reservorio de los aislados productores de BLEE (Nicolas-Chanoine y cols., 2008a; Pitout y cols., 2008; Rodríguez-Baño y cols., 2008a). Estos microorganismos son los responsables de infecciones de origen comunitario como infecciones del tracto urinario, bacteriemias asociadas a las mismas o infecciones intra-abdominales. Además estos pacientes tienen más probabilidad de recibir un tratamiento empírico inadecuado, por lo que los estudios de factores de riesgo son necesarios para adecuar el tratamiento y las medidas de control de la infección (Ben-Ami y cols., 2009; Rodríguez-Baño y cols., 2010).

En varios estudios de pacientes comunitarios se observa un aumento de los aislados de *E. coli* productores de CTX-M y causantes de infecciones del tracto urinario (Arpin y cols., 2009; Ho y cols., 2007; Rodríguez-Baño y cols., 2008b). Sin embargo, son pocos los realizados para conocer la prevalencia de portadores en individuos con este tipo de infecciones y en las personas que conviven con ellos. Los datos de colonización obtenidos en nuestro estudio de convivientes muestran un porcentaje del 70,0% en pacientes con infecciones por microorganismos productores de BLEE. Las cifras para sus convivientes fueron del 16,7% y aumentó hasta el 42,1% cuando se consideraron convivientes de pacientes colonizados, indicando una posible transmisión de las cepas con BLEE en este grupo de pacientes, sin excluir una fuente común (Valverde y cols., 2008b). En un trabajo realizado por Rodríguez-Baño y cols. estudiaron la colonización de pacientes con infección del tracto urinario causada por *E. coli* productor de BLEE, la de sus convivientes y la de familiares que no conviven con ellos. Las cifras de colonización descritas son: 67,9%; 27,4%; y 15,6%, respectivamente para cada grupo (Rodríguez-Baño y cols., 2008c). Todos estos datos sugieren que la colonización por microorganismos productores de BLEE puede ser un factor de riesgo

para sufrir infecciones del tracto urinario por dichas bacterias, así como para incrementar la posibilidad de transmisión de persona a persona.

Otros factores que también pueden influir en la diseminación de BLEE e incluso constituir un reservorio de las mismas es su presencia en el medio ambiente y en alimentos. Los resultados de esta Tesis indican que el porcentaje de aislados procedentes de aguas y alimentos es todavía muy bajo en nuestro entorno (0,2% y 1,0%; respectivamente). En cambio, Jouini y cols. en Túnez, encuentran que el porcentaje *E. coli* productores de BLEE en las muestras de alimentos analizadas alcanzan el 26,0% (Jouini y cols., 2007). En otro estudio realizado en Barcelona por Mesa y cols., la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE en alimentos en el año 2004 fue del 0,4% y en aguas procedentes de una depuradora del 100% (Mesa y cols., 2006). Prado y cols. en 2008 analizaron muestras de efluentes de una planta de tratamiento de un hospital en Brasil, y detectaron un porcentaje de *K. pneumoniae* productor de BLEE del 46,5%, lo que podría constituir una vía de diseminación de estos aislados en el medio ambiente (Prado y cols., 2008). En 2009, en un estudio realizado por Machado y cols. en aguas de efluentes de cuatro hospitales portugueses, aguas de río y de mar cercanas a zonas de vertidos, también se detectó la presencia de enterobacterias productoras de BLEE (Machado y cols., 2009). La posible transmisión de aislados productores de BLEE a través de la cadena alimentaria ha sido sugerida en varios trabajos. En 2003, Prats y cols. (Prats y cols., 2003) detectaron en un campamento la diseminación en 9 de 22 personas de dos cepas de *E. coli* multirresistentes y *Salmonella enterica* procedentes de un brote de gastroenteritis, planteando la posibilidad de que el agua o los alimentos fueran los vehículos de diseminación de estos aislados. En 2008, Lavilla y cols. analizaron muestras de heces de individuos implicados en distintos brotes de gastroenteritis, de manipuladores de alimentos relacionados y no relacionados con los brotes y muestras de alimentos cocinados y crudos (Lavilla y cols., 2008a). El porcentaje de portadores fecales de aislados productores de BLEE fue del 6,4% entre los comensales y del 27,5% en los manipuladores de alimentos sin contacto con brotes. En 10 de los brotes asociados a BLEE, se identificó la misma cepa entre todos los comensales y en uno de ellos, uno de los manipuladores también fue colonizado por el mismo clon. La prevalencia de los aislados productores de BLEE en alimentos cocinados fue del 0,3% y en alimentos crudos del 26,7%. A pesar de que las muestras de alimentos analizadas no procedían de ninguno de los brotes, este estudio sugiere la posible vía de transmisión de

microorganismos productores de BLEE a través de los alimentos, probablemente desde dos reservorios: los animales destinados a consumo humano y los manipuladores de alimentos.

Por otra parte, existen diversos trabajos que demuestran que tanto los animales de granja como de compañía e incluso los de vida libre son portadores de microorganismos productores de BLEE (Carattoli, 2008; Costa y cols., 2006; Poeta y cols., 2009; Sun y cols., 2009; Torres y cols., 2007). En los distintos estudios se ha constatado un aumento de los animales portadores de aislados productores de BLEE, especialmente de aquellos con enzimas de tipo CTX-M (Carattoli, 2008; Sun y cols., 2009; Torres y cols., 2007). Las especies donde se detectan estos aislados mayoritariamente son *E. coli* y *S. enterica*. Parece que existe una correlación entre las variantes de BLEE detectadas en los aislados de origen humano y animal en un mismo país. Así, en España las variantes más detectadas en aislados animales son las del grupo CTX-M-9 y SHV-12, lo que también ocurre en humanos (Briñas y cols., 2005b; Diestra y cols., 2008), en Japón la enzima CTX-M-2 es muy prevalente tanto en aislados de animales como de humanos (Hawkey, 2008; Kojima y cols., 2005) o en Portugal donde TEM-52 se ha detectado tanto en aislados de animales de compañía, salvajes y como en humanos (Costa y cols., 2004; Costa y cols., 2006; Machado y cols., 2007). Más recientemente, Ewers y cols. han descrito la presencia del clon de *E. coli* O25:H4-ST131 productor de CTX-M-15 responsable de la pandemia en humanos, en aislados procedentes de mascotas de distintos países europeos (Ewers y cols., 2010). Estos estudios reflejan, al igual que en los humanos, el papel del intestino animal como reservorio de microorganismos productores de BLEE, y no se puede descartar la cadena alimentaria, en el caso de animales destinados al consumo humano o la convivencia con animales de compañía como vía de la diseminación de estos microorganismos entre ambas especies.

Nuestro estudio revela un aumento tanto en la diversidad como en la prevalencia de BLEE de distintos orígenes a lo largo del tiempo de BLEE. Las enzimas más prevalentes en el ámbito comunitario en todos los estudios de portadores y de aguas y alimentos fueron CTX-M-14 y SHV-12. La detección en 2007 de enzimas del grupo CTX-M-1, presentes tanto en aislados de origen nosocomial y comunitario, pone de manifiesto el cambio en la epidemiología de BLEE. En nuestro país, distintos estudios revelan la presencia mayoritaria de aislados productores de CTX-M-14 y SHV-12 (Diestra y cols., 2008; Romero y cols., 2005). En un trabajo reciente de Rodríguez-Baño y cols., se describe una epidemiología similar en los aislados de *E. coli* de origen comunitario productores de CTX-M y SHV, siendo

ambos causantes de infecciones en la comunidad (Rodríguez-Baño y cols., 2009). En otros estudios de diferentes países, las enzimas de tipo CTX-M-14 son también mayoritarias en aislados de la comunidad, causando incluso brotes epidémicos (Ho y cols., 2007; Pitout y cols., 2005a; Tian y cols., 2008).

El análisis de la estructura poblacional mediante PFGE de los aislados de *E. coli* productores de BLEE, mostró una gran variabilidad genética, poniendo de manifiesto que la diseminación de estos aislados no depende tanto de la dispersión clonal como de los elementos dónde se vehiculan los genes *bla*<sub>BLEE</sub>. En otros estudios donde este análisis se realiza mediante MLST, la población de *E. coli* se distribuye en varias secuencias tipo (Oteo y cols., 2009b; Rodríguez-Baño y cols., 2004). La utilización del MLST es una herramienta extremadamente útil a la hora de conocer la epidemiología de los aislados de *E. coli* productores de BLEE y de aislados uropatogénicos o enteropatogénicos (Lau y cols., 2008b; Pitondo-Silva y cols., 2009) y para la detección de clones epidémicos diseminados en diferentes países como ha ocurrido en el caso de los aislados productores de CTX-M-15 pertenecientes al clon ST131 ampliamente distribuido en todo el mundo (Coque y cols., 2008b; Nicolas-Chanoine y cols., 2008b) o de ST69 (Manges y cols., 2008; Tartof y cols., 2005)

El uso previo de antimicrobianos ha sido descrito como uno de los factores de riesgo para la adquisición de aislados productores de BLEE tanto en la comunidad como en el hospital (Ben-Ami y cols., 2009; Katsandri y cols., 2008). La presencia de resistencias múltiples a antibióticos no beta-lactámicos en los aislados productores de BLEE puede contribuir a su selección y su diseminación. En nuestros aislados procedentes de portadores fecales, se observó una disminución notable de la sensibilidad a fluoroquinolonas. La resistencia a este grupo de antimicrobianos en los aislados productores de BLEE se ha convertido en una característica habitual de los mismos (Kariuki y cols., 2007; Kim y cols., 2008; Rooney y cols., 2009). El aumento de las tasas de resistencia en los últimos años es debido a la presencia de enzimas de la familia QNR o una variante de la acetilasa modificante de aminoglucósidos denominada AAC(6')-Ib-cr (Crémet y cols., 2009; Dahmen y cols., 2010; Hawkey y cols., 2009; Lavilla y cols., 2008b).

Los porcentajes de resistencia obtenidos para estreptomicina, sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclinas fueron superiores al 50,0%. Este hecho podría estar relacionado con las estructuras genéticas de los genes *bla*<sub>BLEE</sub> en las que se incluyen también estos genes

de resistencia (Machado y cols., 2005; Novais y cols., 2006). Las tasas de resistencia a aminoglucósidos observadas en los distintos estudios de portadores fueron variables, con valores más elevados en el año 2007. La resistencia a aminoglucósidos se ha asociado con la presencia de los genes de enzimas modificantes en integrones o transposones que también incluyen los genes *bla*<sub>BLEE</sub> (Gruteke y cols., 2003; Jones y cols., 2005; Machado y cols., 2007) y a la reciente caracterización de 16S ARNr metilasas (Bogaerts y cols., 2007; Doi y cols., 2007).

El aumento de aislados multiresistentes productores de BLEE ha sido ampliamente descrito en diferentes estudios y está relacionado con la adquisición de nuevos genes de resistencias más que con eventos mutacionales (Coque y cols., 2008a; Martínez-Martínez, 2007).

Los estudios epidemiológicos de detección y caracterización de BLEE realizados en esta tesis demuestran la distribución de las BLEE en las distintas especies bacterianas procedentes del ámbito hospitalario, la comunidad o el medio ambiente. Estos estudios ayudan a conocer la evolución de los aislados productores de BLEE a lo largo del tiempo lo que permitiría establecer medidas de control que limiten su diseminación entre los distintos compartimentos.



## 2. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *K. pneumoniae* PRODUCTOR DE BLEE

*K. pneumoniae* es un importante patógeno causante de infecciones asociadas con la hospitalización como bacteriemias, infecciones del tracto urinario o neumonía nosocomial en pacientes de UCI (Podschun y cols., 1998). Asimismo, es relevante su papel en infecciones de origen comunitario como neumonía o abscesos hepáticos (Keynan y cols., 2007).

*K. pneumoniae* es un ejemplo de microorganismo multiresistente, siendo una de las enterobacterias más frecuentemente asociadas a la producción de BLEE. En un estudio realizado en 2003 en Estados Unidos, el 20,6% de los aislados de *K. pneumoniae* procedentes de pacientes de UCI eran resistente a cefalosporinas de tercera generación (Paterson, 2006). Los datos del estudio EARSS de 2008 reflejaron un aumento de los aislados de *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de tercera generación, especialmente en países del centro y suroeste de Europa (EARSS, 2008). Además un 14,0% de estos aislados eran también resistentes a fluoroquinolonas y aminoglucósidos. La reciente descripción de nuevos mecanismos de resistencia a distintas familias de antibióticos y la posible adquisición de las mismas, subraya el riesgo de aparición de aislados de *K. pneumoniae* resistentes a todas las alternativas terapéuticas (Falagas y cols., 2007).

Las carbapenemas han sido los principales antibióticos de elección para el tratamiento de las infecciones causadas por *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE, aunque en los últimos años también han aparecido aislados resistentes en diferentes países (Giske y cols., 2008; Paterson, 2006). Esta resistencia en *K. pneumoniae* se ha asociado con la expresión de AmpC o de BLEE y la pérdida de proteínas de membrana, la producción de metalo-beta-lactamasas o de carbapenemasas tipo KPC (Paterson, 2006). En nuestro hospital se han descrito recientemente aislados productores de SHV-12 y de VIM-1 (Tato y cols., 2007), y productores de KPC-3 y CTX-M-10 asociados al clon epidémico de *K. pneumoniae* ST388 (Curiao y cols., 2010) persistente desde 1998 (Tabla 21). La presencia de estos aislados supone una limitación en cuanto al arsenal terapéutico disponible para el tratamiento de las infecciones por este tipo de microorganismos.

A pesar de que en los últimos años la prevalencia de los aislados de *E. coli* productores de BLEE ha aumentado de manera considerable especialmente en la comunidad, no puede obviarse la compleja epidemiología de *K. pneumoniae* productor de BLEE. En esta tesis, se han estudiado las características epidemiológicas de los aislados de *K. pneumoniae* productor de BLEE obtenidos en el Hospital Universitario Ramón y Cajal desde 2001 a 2006

y su comparación con los obtenidos desde su primera descripción en 1989 (Coque y cols., 2002; Valverde y cols., 2008a).

Muchos de los estudios de epidemiología de aislados de *K. pneumoniae* productor de BLEE se han llevado a cabo en situaciones de brotes epidémicos (Carrër y cols., 2009; Holländer y cols., 2001; Peña y cols., 1998; Peña y cols., 2001; Velasco y cols., 2009) o en momentos puntuales (Diestra y cols., 2008; Jeong y cols., 2004; Luzzaro y cols., 2006; Minarini y cols., 2008; Paterson y cols., 2003), siendo pocos los estudios longitudinales realizados en una misma institución que permitan el seguimiento y evolución de los mismos (Coque y cols., 2002; Elhani y cols., 2010; Romero y cols., 2005; Shu y cols., 2010). En nuestro estudio, la frecuencia de los aislados de *K. pneumoniae* productores de BLEE durante el periodo 1989-2000 fue mayor que la observada en 2001-2006 (4,8% vs 3,4%). Esto se debe a un brote hospitalario por *K. pneumoniae* productor de TEM-4 ocurrido durante los años 1997 y 1998 dónde los porcentajes de estos aislados fueron de 12,1% y 18,1%, respectivamente (Asensio y cols., 2000; Coque y cols., 2002). La mayoría de los aislados de nuestra colección tiene un origen hospitalario, aunque los aislados procedentes de la comunidad muestran un crecimiento continuo en el tiempo. El porcentaje global de *K. pneumoniae* con BLEE en el Hospital Ramón y Cajal desde 1989 a 2006 (3,8%) es similar a los observados en nuestro país, como el caso de Romero y cols., en Andalucía dónde la prevalencia es del 3,98% (Romero y cols., 2005) y el de Romero y cols., en Salamanca dónde el porcentaje es del 2,9% (Romero y cols., 2007). En cambio, es inferior a la observada en otros estudios multicéntricos llevados a cabo en España y en otros países. En el caso del trabajo llevado a cabo en 44 hospitales españoles durante 2006, el porcentaje de *K. pneumoniae* productor de BLEE alcanzó el 5,04% (Ángel Díaz y cols., 2009). En otros países la prevalencia varía de 4,2% en Nueva Zelanda (Heffernan y cols., 2009), a 7,89% en Túnez (Elhani y cols., 2010), 12,7% en Tailandia (Kiratisin y cols., 2008), 19,8% en Brasil (Minarini y cols., 2008), 23,4% en Taiwán (Shu y cols., 2010) y 49,0% en Turquía (Koksall y cols., 2009).

La caracterización de las BLEE obtenidas en nuestro estudio mostró la evolución a lo largo del tiempo en la distribución de estas enzimas. Cabe resaltar un aumento de la diversidad en el último periodo analizado en esta tesis (2001-2005). Esta situación también se pone de manifiesto en otros estudios multicéntricos llevados a cabo en nuestro país (Diestra y cols., 2008; Hernández y cols., 2005). Tanto los aislados productores de TEM-4, SHV-2 y

CTX-M-10 descritos inicialmente a finales de los años 80 y principios de los 90 y los productores de SHV-12 y CTX-M-15 que surgen en el periodo 2001-2005, siguen siendo identificados hasta la fecha. Los aislados productores de CTX-M-15, que se encuentran distribuidos globalmente (Damjanova y cols., 2008; Elhani y cols., 2010; Heffernan y cols., 2009; Mesko Meglic y cols., 2009; Shu y cols., 2010), aparecen en nuestro estudio en 2002, sólo un año después de su primera descripción (Karim y cols., 2001). Otras enzimas prevalentes en *E. coli* en nuestro país como CTX-M-9 o CTX-M-14 (Novais y cols., 2006; Rodríguez-Baño y cols., 2004) están menos representadas en los aislados de *K. pneumoniae* de este estudio. Esta situación también se describe en un estudio multicéntrico en nuestro país donde el 21,9% (7/32) de las BLEE corresponden a CTX-M-9 y el 6,3% (2/32) a CTX-M-14 (Diestra y cols., 2008).

El análisis de la estructura poblacional y de los elementos de transferencia horizontal demostró que la persistencia de determinadas enzimas estaba ligada a la existencia de clones epidémicos y al mantenimiento de determinados plásmidos en diferentes clones.

La detección de aislados de *K. pneumoniae* productores de TEM-4 persiste desde 1989 a 2005, asociada a clones epidémicos y plásmidos altamente transmisibles. Los resultados muestran la presencia de un plásmido (pRYCE11) en distintos clones de los años 1989-2000 (uno de ellos responsable de un brote epidémico en UCIs durante 9 meses) (Asensio y cols., 2000; Coque y cols., 2002) y el otro (pRYCE26) detectado principalmente en pacientes extrahospitalarios en el periodo 2001-2005. Este hecho demuestra la persistencia a lo largo del tiempo de un plásmido específico, capaz de movilizarse entre distintas cepas de distintos compartimentos. Recientemente, se ha descrito en España un brote causado por 2 clones productores de TEM-4 en una unidad de neonatos donde ambos portaban plásmidos similares (Velasco y cols., 2009).

La presencia de aislados productores de CTX-M-10 se detecta también a lo largo de ambos periodos estudiados. El primer aislado productor de CTX-M-10 se describió en 1997 en el Hospital Ramón y Cajal en una cepa de *E. coli* (Oliver y cols., 2001) y desde entonces se ha diseminado en distintas especies de enterobacterias asociada a un elemento relacionado con fagos (Oliver y cols., 2005). La epidemiología de los aislados productores de CTX-M-10 se encuentra prácticamente restringida a España (Cartelle y cols., 2006; Hernández y cols., 2005; Riaño y cols., 2009; Oliver y cols., 2005), con escasos ejemplos de descripción en otros países (Lartigue y cols., 2005). En los aislados de *K. pneumoniae* productores de CTX-M-10

del periodo 1989-2000 no se detectan ni clones epidémicos ni plásmidos altamente transmisibles. En cambio, en un estudio realizado en nuestro hospital con aislados de *Enterobacter* spp. productores de BLEE (Cantón y cols., 2002) se detectaron dos clones de *E. cloacae* productores de CTX-M-10, uno desde 1997 a 2000 diseminado en distintas áreas del hospital y otro en 1999 y 2000 en el área de traumatología. En el periodo 2001-2005, a pesar de no existir una clara dispersión clonal, el mismo plásmido (pRYCE30) se detectó en diferentes clones y años, principalmente en el ámbito hospitalario.

El primer aislado de *K. pneumoniae* productor de SHV-12 se detectó en 2001 y desde entonces se ha diseminado con éxito tanto en el ámbito nosocomial como en el comunitario. Dentro de estos aislados, se describió la persistencia de un clon de *K. pneumoniae* productor de SHV-12 (Kp49S) en un brote no documentado *a priori* durante 2 años en distintas áreas del hospital. Todos los aislados eran portadores del mismo plásmido (pRYCE28). Los brotes epidémicos tanto de clones productores de SHV-12 como de plásmidos han sido recogidos por distintos autores, todos ellos procedían del ambiente hospitalario (Al-Obeid y cols., 2009; Ben-Hamouda y cols., 2004; Oteo y cols., 2008; Pagani y cols., 2000). La presencia de un plásmido con el mismo perfil de restricción (pRYCE38), en distintos clones productores de SHV-2 y SHV-12 podría reflejar la evolución por mutación de estas BLEE tal y como se ha sugerido en otros trabajos (Ben-Hamouda y cols., 2004; Kim y cols., 2002).

En los últimos años se ha experimentado un aumento de los aislados productores de CTX-M-15 a nivel mundial en distintas especies de enterobacterias (Cantón y cols., 2006; Coque y cols., 2008b). En nuestro caso, el primer aislado de *K. pneumoniae* productor de CTX-M-15 se detectó en el año 2002 y hasta 2005 su diseminación se ha producido principalmente en asociación con el hospital. La mayoría de los aislados productores de CTX-M-15 (69,2%; 9/13) pertenecieron al mismo clon (Kp47C), asociado al plásmido pRYCE34 y diseminado desde 2002 hasta 2005 en varias áreas del hospital. En el último año han sido varios los brotes descritos por aislados productores de esta enzima que incluyen no sólo la diseminación en un mismo hospital, como ha ocurrido en España, Francia y Suecia (Ruiz y cols., 2010; Carrër y cols., 2009; Lytsy y cols., 2008) sino también entre distintos hospitales como el caso de Barcelona (Coelho y cols., 2009) o en distintas localizaciones geográficas como un estudio llevado a cabo en la India, dónde se analizaron muestras fecales de enfermos con diarrea y se describió un mismo clon productor de CTX-M-15 en tres zonas distintas del país (Muzaheed y cols., 2009).

A pesar de la existencia de clones epidémicos, el análisis de los resultados de MLST mostró una gran diversidad de ST, y no se encontró ninguna asociación clara entre el tipo de BLEE o el origen de los aislados o los tipos de muestras y las ST específicas. No obstante, se describen ST ampliamente diseminadas en el mundo, como el caso de ST15 en un aislado productor de CTX-M-15, causante de brotes epidémicos como el ocurrido en Hungría recientemente (Damjanova y cols., 2008). Asimismo, todas las ST asignadas a los aislados con CTX-M-15 (ST15, ST16, ST13 y ST134) son diferentes a los encontrados en un trabajo realizado por Oteo y cols. (Oteo y cols., 2009c) donde se analizan 162 aislados de *K. pneumoniae* productores de CTX-M-15 de 5 hospitales distintos de España procedentes de recién nacidos y adultos y donde las ST descritas se asocian tanto a aislados clínicos causantes de infecciones como aislados colonizadores. En otro trabajo realizado en Túnez (Elhani y cols., 2010), se describen las ST101 y ST107 productoras de CTX-M-15 como causantes de sendos brotes en UCI y en la Unidad de Pediatría del hospital. Este mismo trabajo también presenta una gran diversidad de ST en el caso de los aislados productores de SHV-12, al igual que ocurre en nuestra colección. Cabe resaltar la presencia de ST virulentas, como ST14, causantes de mastitis en vacas, de distintas infecciones en humanos y asociados a productores de enzimas del tipo SHV y productores de KPC (Brisse y cols., 2009; Hrabák y cols., 2009; Paulin-Curlee y cols., 2007). En el caso de ST388, un clon persistente desde 1998 hasta 2003 como productor de CTX-M-10, se ha descrito recientemente en nuestra institución como un clon productor de KPC-3 y de CTX-M-10 (Curiao y cols., 2010). Este resultado podría reafirmar la mayor facilidad de clones persistentes en la adquisición de nuevos elementos genéticos de resistencia. La presencia de ST13 y ST37 se ha descrito en aislados productores de AmpC plasmídicas (DHA-1) en un hospital de Cataluña, donde 3 de los clones eran también productores de CTX-M-15, a diferencia de los detectados en este estudio que son productores de SHV-12, CTX-M-10 y TEM-4 (Diestra y cols., 2010).

La diseminación de clones epidémicos también se ha asociado a otro tipo de mecanismos de resistencia como la producción de carbapenemasas. En varios estudios recientes se ha descrito la diseminación del clon ST258 en aislados productores de KPC en diferentes países como Estados Unidos, Finlandia, Italia, Noruega, Polonia y Suecia (Baraniak y cols., 2009; Endimiani y cols., 2009; Kitchel y cols., 2009; Osterblad y cols., 2009; Samuelsen y cols., 2009) o ST344 y ST348 en España (Curiao y cols., 2010) lo que

pone de manifiesto la utilidad del MLST para el conocimiento de la epidemiología de aislados resistentes.

El análisis de los grupos filogenéticos de *K. pneumoniae* mostró una alta representación de KpI (75,6%), seguido de KpIII (19,2%) y de KpII (1,3%). Los trabajos sobre la distribución de *K. pneumoniae* en los distintos grupos filogenéticos son todavía escasos, aunque en todos ellos el grupo mayoritario es KpI. En el análisis llevado a cabo por Brisse y cols. (Brisse y cols., 2004) sobre 420 aislados clínicos, el 82,1% (n=345) perteneció al grupo KpI, el 11,0% (n=46) a KpIII y el 6,9% (n=29), cifras similares a las obtenidas en nuestros aislados. Este mismo autor, en un trabajo con 100 aislados clínicos de animales también encuentra un mayor porcentaje de aislados del grupo KpI (78%) que de KpIII (8%) y KpII (5%) (Brisse y cols., 2005). Es interesante remarcar el hecho de la clara relación que existe entre los aislados productores de CTX-M-10, muchos de ellos nosocomiales, y el grupo filogenético KpIII. Este grupo se ha asociado con un origen medioambiental y a la enzima cromosómica LEN, lo que también ocurre en nuestro caso (Haeggman y cols., 2004).

### 3. EPIDEMIOLOGÍA DE CTX-M-2, CTX-M-14 y SHV-12

#### 3.1 CTX-M-2

En esta Tesis se incluye el estudio del entorno genético (In117) del primer aislado productor de CTX-M-2 obtenido en el Hospital Universitario Ramón y Cajal en 2003. La presencia de aislados con CTX-M-2 está ampliamente evidenciado en determinadas localizaciones geográficas como en Japón (Hawkey, 2008), diversos países de América del Sur (Villegas y cols., 2008) y en Israel (Chmelnitsky y cols., 2005), dónde su prevalencia a pesar de la aparición de otras enzimas de tipo CTX-M, sigue siendo alta. En nuestro país su prevalencia es extremadamente baja y son pocos los estudios dónde se aíslan (Cendejas y cols., 2010; Miró y cols., 2005). A pesar de ello, la presencia de esta enzima aumenta la diversidad de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> descritos en nuestro entorno.

El integrón In117 dónde se localiza el gen *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, pertenece a la familia In0. El gen *bla*<sub>CTX-M-2</sub> se ha asociado con otros integrones de clase 1 que también contienen *ISCR1* (anteriormente conocido como *orf513*) en diferentes especies de enterobacterias como *S. enterica* (InS21), *M. morganii* (In116) y *P. mirabilis* (In35). Estos integrones están muy relacionados con la familia de In6/In7 y presentan diferentes casetes de genes: *aac(6')-Ib-bla*<sub>OXA-2-*orfD*</sub> en InS21 e In35 (Arduino y cols., 2002; Di Conza y cols., 2002) y *aacA4-bla*<sub>OXA-2-*orfD*</sub> en In116 (Power y cols., 2005). El cassette de genes de In117 situado en la región 5'CS1-3'CS1 (*estX-aadA1*) no se había descrito hasta el momento asociada a CTX-M-2, aunque sí en aislados clínicos de *Shigella sonnei* asociados a integrones de clase 1 (DeLappe y cols., 2003). El gen *estX*, que confiere resistencia a estreptotricina, se ha localizado en distintos integrones de clase 1 y 2 en aislados de la comunidad y distintas localizaciones geográficas (Ahmed y cols., 2005; Bischoff y cols., 2005). Este gen presenta una identidad de secuencia de aminoácidos del 90% con *sat-1* del Tn1825. Partridge y cols. han demostrado que *sat-1* es el resultado de la fusión de los genes *estX* y *sat-2* (Partridge y cols., 2005b). Los resultados obtenidos en la caracterización del elemento muestran la presencia del gen *bla*<sub>CTX-M-2</sub> en un transposón defectivo derivado de Tn402 y que constituye junto con In34 e In6 uno de los ejemplos dónde se ha caracterizado la estructura que se localiza detrás de 3'CS2 (Partridge y cols., 2003), donde se incluyen *qacEΔ1*, *sul1* y *orf5* seguidos de IS1326 (perteneciente a la familia de IS21) y el módulo de transposición truncado

(*tniBA1-tniA*). Aunque los miembros de la familia de IS21 tienen una amplia distribución, IS1326 permanece ligada a integrones de clase 1 del grupo In0-In2-In5 (Brown y cols., 1996; Partridge y cols., 2001a; Partridge y cols., 2003). Este grupo se diferencia en el promotor de *intI1* en las secuencias presentes en el módulo de transposición *tni*.

Estas estructuras también se han descrito en nuestro entorno en BLEE ampliamente diseminadas como CTX-M-9 o en metalo-beta-lactamasas como VIM-1 (Novais y cols., 2006; Tato y cols., 2010). In0, In2 e In5 son derivados de Tn402 localizados en plásmidos y/o transposones, a menudo en transposones mercuriales como Tn21. Estos transposones se consideran como una población ampliamente diseminada con pocas variantes y que se encuentran tanto en bacterias gram-negativas medioambientales como clínicas (Yurieva y cols., 1997). El transposón Tn21 está implicado en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos y a mercurio puesto que está asociado a integrones y distintos genes de resistencia a mercurio (operón *mer*). Las causas de la diseminación de la familia de Tn21 podrían deberse a la presión antibiótica sufrida por la microbiota intestinal y la exposición a distintas fuentes de mercurio (Liebert y cols., 1999). La ausencia en In117 del módulo de transposición del Tn21 corriente arriba de *intI1* no es de extrañar, puesto que estos transposones suelen estar inactivados o formar estructuras mosaico mediante el intercambio por recombinación de módulos de transposición en el sitio *res* (Noguchi y cols., 2000; Partridge y cols., 2001b, Yurieva y cols., 1997).

Las diferencias que se encuentran en la región 5'CS1-3'CS1 de los distintos integrones asociados a *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (Arduino y cols., 2003), sugieren posibles recombinaciones entre los diferentes casetes de los distintos integrones de clase 1 o entre CR1 y los integrones de clase 1 que contienen la región 3'CS-1 (Boyd y cols., 2002; Partridge y cols., 2002a; Partridge y cols., 2002b; Partridge y cols., 2003).

### 3.2 CTX-M-14 Y SHV-12

Los resultados obtenidos en los distintos estudios que conforman esta tesis, muestran que dos de las enzimas más prevalentes, sobre todo en el ámbito comunitario, son CTX-M-14 y SHV-12. Estos datos no son un hecho aislado, ya que distintos estudios epidemiológicos muestran también esta mayor prevalencia (Cantón y cols., 2006; Cantón y cols., 2006; Diestra y cols., 2008; Hernández y cols., 2005; Hawkey, 2008; Romero y cols., 2005). Para conocer mejor su



epidemiología y los posibles factores implicados en su diseminación, en esta tesis se estudiaron más en profundidad los aislados productores de CTX-M-14 y SHV-12 caracterizando su estructura poblacional, sus plásmidos y los entornos genéticos (Valverde y cols., 2009).

### 3.2.1 CTX-M-14

El análisis de la estructura poblacional de los aislados de *E. coli* productores de CTX-M-14 muestra una alta representación en aislados procedentes de la comunidad causantes de infección urinaria de los grupos filogenéticos A y B1 además del grupo D. Esta distribución es similar a la encontrada por Blanco y cols. en un estudio llevado a cabo en un hospital de Galicia, dónde también está presente el grupo B2 (Blanco y cols., 2009). En cambio, se contrapone a la situación de otros países dónde en su mayoría pertenecen al grupo D y en menor medida a B2 (Pitout y cols., 2005a; Pitout y cols., 2005b). Entre los aislados de *E. coli* productores de CTX-M-14 pertenecientes al grupo A hay una sobrerrepresentación del complejo clonal ST10, que se ha identificado en aislados fecales de personas sanas, cepas enterotoxigénicas aisladas en la comunidad y más recientemente, aislados productores de BLEE causantes de infecciones del tracto urinario (Leflon-Guibout y cols., 2008; Oteo y cols., 2009b; Turner y cols., 2006; Wirth y cols., 2006). También algunos aislados productores de CTX-M-14 del grupo B1 se asocian con ST155 y ST359 y se han descrito en pacientes de la comunidad con infecciones del tracto urinario (Minarini y cols., 2007; Wirth y cols., 2006).

La mayoría de aislados de *E. coli* causantes de infecciones del tracto urinario (uropatogénicos) pertenecen a los grupos B2 y D y algunos de ellos se encuentran globalmente diseminados como clones uropatogénicos como es el caso de ST131, ST69, ST14, ST73 y ST95 (Cagnacci y cols., 2008a; Lau y cols., 2008a; Tartof y cols., 2005). En este estudio, sólo una de las cepas del grupo D perteneció al complejo clonal ST69 (ST106) presentó el polimorfismo C288T, específico para el grupo clonal A de *E. coli*, responsable de infecciones epidémicas del tracto urinario en la comunidad (Johnson y cols., 2005; Tartof y cols., 2005).

Aunque los grupos A y B1 raramente se encuentran implicados en infecciones extraintestinales, son prevalentes como organismos comensales tanto en animales como en humanos, y suelen ser enterotoxigénicos, enterohemorrágicos y en algunos casos enteroagregativos, dónde cada patotipo está ligado a unos determinados factores de virulencia

ocasionalmente vinculados a clones ampliamente diseminados (Escobar-Páramo y cols., 2004; Jauregui y cols., 2008; Turner y cols., 2006, Wirth y cols., 2006).

Los resultados obtenidos muestran que el gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> se encuentra localizado en plásmidos del complejo IncI o del grupo IncHI2. La mayoría de los plásmidos descritos (pRYC105, pRYC108 y pRYC109) pertenecen al grupo IncK. Un cuarto tipo descrito (pRYC106) es del grupo IncI y en menor medida (pRYC110) pertenece al IncHI2. La asociación de *bla*<sub>CTX-M-14</sub> con estos grupos de incompatibilidad se ha descrito también en varios trabajos tanto a nivel nacional como en otros países (Carattoli, 2009, Diestra y cols., 2009, Hopkins y cols., 2006, Marcadé y cols., 2009, Navarro y cols., 2007a).

Es reseñable la estabilidad del plásmido pRYC105 a lo largo del tiempo y en diferentes linajes de *E. coli*, lo que sugiere un alto grado de adaptación a determinados entornos genéticos. Sin embargo, la presencia de plásmidos epidémicos portadores de *bla*<sub>CTX-M-14</sub> en cepas de pacientes de la comunidad y en animales de granja (Liebana y cols., 2006) puede dar lugar a reservorios de plásmidos altamente transmisibles en poblaciones heterogéneas de *E. coli* que pueden colonizar diferentes ambientes y también ser capaces de evolucionar por recombinación hacia variantes más virulentas, como parece que ha ocurrido con p026-Vir (GenBank NC\_012487.1) y pCooKm (Froehlich y cols., 2005).

Los plásmidos del grupo IncK se han aislado de pacientes con infecciones del tracto urinario desde 1970 (Araki y cols., 1983, Dudley y cols., 2006). En plásmidos IncK, como el caso de pSERB1 se ha descrito un sistema de secreción de tipo IV que está implicado tanto en la conjugación como en la adherencia de células epiteliales en superficies abióticas (Dudley y cols., 2006) que puede facilitar la colonización del compartimento intestinal por *E. coli*, aumentando así el perfil patogénico de determinados clones o grupos clonales (Dudley y cols., 2006, Oshima y cols., 2008). La adquisición de plásmidos del grupo IncK que contienen el gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> por parte de clones de *E. coli* de los grupos A y B1 podría aumentar su capacidad de colonización del tracto urinario en pacientes expuestos a antibióticos, como muestra el hecho de las altas tasas de resistencia que presentan los aislados de *E. coli* productores de CTX-M-14 causantes de infecciones del tracto urinario (65,6%).

El esquema utilizado en la caracterización ha permitido describir un plásmido IncI recombinante (pRYC106) con una homología del 99,0% con la replicasa de pSERB1 y del 100,0% con la relaxasa de pCVM29188. La presencia de plásmidos recombinantes suele producirse en la naturaleza, como en el caso de pSC138 (GenBank NC\_007365) y pO113

(Leyton y cols., 2003) que sólo contienen sistemas de conjugación relacionados con el grupo IncI, el plásmido pCooKm (Froehlich y cols., 2005) que contiene la región de replicación del grupo IncI y la región de conjugación de IncF, o el plásmido p026-Vir, que contiene dos replicasas del grupo IncF y dos relaxasas similares a plásmidos IncK.

A pesar de que la frecuencia de plásmidos IncHI2 en nuestro estudio es baja, su papel en la diseminación del gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> no debe ser subestimado, ya que se ha descrito en otras localizaciones sugiriendo su amplia diseminación (Navarro y cols., 2007a).

Los datos obtenidos sobre los plásmidos que contienen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> en otros países hacen pensar que también haya otros grupos de incompatibilidad implicados en su diseminación como los grupos IncA/C, IncFIB o IncFII (Carattoli, 2009, Marcadé y cols., 2009).

En este estudio se describen dos variantes del gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, designadas como *bla*<sub>CTX-M-14a</sub> y *bla*<sub>CTX-M-14b</sub>. Estas variantes se encuentran localizadas en diferentes plataformas genéticas (*ISEcp1* e *ISCR1*) asociadas con plásmidos IncK, IncHI2 e IncI-like, lo que sugiere diferentes eventos de movilización y los subsecuentes procesos de recombinación entre plásmidos. La variante *bla*<sub>CTX-M-14b</sub> se ha descrito en España y en Túnez (Navarro y cols., 2007a; Vinué y cols., 2009; GenBank EU274579 ). Su localización en un plásmido IncHI2 y asociada a *ISCR1*, al igual que ocurre con *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, refleja una posible evolución por mutación de estos genes (Navarro y cols., 2007a; Novais y cols., 2006). La asociación de *bla*<sub>CTX-M-14</sub> con *ISEcp1* ha sido descrita por otros autores (Lartigue y cols., 2004; Navarro y cols., 2007a; Vinué y cols., 2009). La distancia intergénica de 42 pb identificada entre ambos genes y en otros de la familia de CTX-M-9 que presentan esta misma estructura como CTX-M-9, -16, -17, -19, -21, -24 y Toho-2 (GenBank AF174129, AY033516, AF454633, AF458080, AJ416346, NC\_011617 y D89862, respectivamente) sugeriría un único origen de todas estas variantes (Barlow y cols., 2008).

### 3.2.2 SHV-12

El análisis de la estructura poblacional de los aislados de *E. coli* productores de SHV-12, muestra una alta presencia de aislados procedentes de la comunidad causantes de infección urinaria pertenecientes a los grupos D, A y en menor medida a B1. Los aislados productores de *E. coli* productores de SHV-12, presentan una mayor diversidad de ST, no siendo tan clara la asociación entre determinados filogrupos y ST específicas. En el caso de aislados del grupo

A, se detectan clones pertenecientes al complejo clonal ST23 y ST10 descritos también por Oteo y cols. en aislados productores de esta misma enzima (Oteo y cols., 2009b).

La estructura poblacional de los aislados de *K. pneumoniae* productores de SHV-12, muestra la mayor frecuencia de aislados procedentes del ámbito hospitalario, perteneciendo todos al grupo filogenético KpI.

Los datos obtenidos muestran que el gen *bla*<sub>SHV-12</sub> se encuentra asociado a plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncI, IncN, IncA/C, IncFIB y a cointegrados de los grupos IncI e IncN. A pesar de que las enzimas *bla*<sub>SHV</sub> se encuentran ampliamente diseminadas, son escasos los estudios sobre los plásmidos que portan estos genes. Estos trabajos muestran la asociación del gen *bla*<sub>SHV-12</sub> con los grupos de incompatibilidad IncII, IncK, IncN, IncHI2, IncFIB, IncFII e IncA/C en diferentes hospedadores y con tamaños que varían desde los 55 hasta las 340 Kb (Carattoli, 2009; Carattoli y cols., 2010; Diestra y cols., 2009; Marcadé y cols., 2009).

La asociación de genes *bla*<sub>SHV</sub> con plásmidos IncN ha sido escasamente descrita hasta el momento. En 2010, Carattoli y cols. han secuenciado el plásmido pKOX105 portador de los genes *bla*<sub>VIM-1</sub>, *qnrS* y *bla*<sub>SHV-12</sub> y lo compararon con otros dos plásmidos (p9 y p12) donde se encuentran los genes de resistencia a carbapenemas *bla*<sub>KPC-2</sub> y *bla*<sub>KPC-3</sub>, respectivamente. En el análisis encuentran que los tres plásmidos presentan una alta homología en su estructura central, sugiriendo la existencia de un ancestro común a partir del cual se habrían generado las distintas variantes mediante eventos de adquisición, delección o inversión (Carattoli y cols., 2010). En cambio, sí están bien estudiados los plásmidos IncN en el caso de enzimas de la familia de CTX-M-1 (Moodley y cols., 2009; Novais y cols., 2007; Rodríguez y cols., 2009). En el estudio de Moodley y cols. se describe la transmisión entre aislados de *E. coli* cerdos y granjeros de este tipo de plásmidos y Rodríguez y cols. los detectan en aislados de *Salmonella enterica* procedentes de alimentos y animales de granja. La presencia de los plásmidos IncN se ha descrito también en aguas residuales humanas y de granjas y en excrementos porcinos utilizados como abono (Binh y cols., 2008; Moura y cols., 2010) lo que podría sugerir que los aislados animales podrían actuar como reservorio de estos plásmidos, lo que podría suponer una transmisión a humanos por la cadena alimentaria o por contacto con los mismos.

En resumen, el aumento en la prevalencia de portadores fecales de enterobacterias productoras de BLEE, principalmente *E. coli*, no sólo en pacientes hospitalizados sino también en individuos de la comunidad, refuerza la importancia del tracto intestinal como reservorio de estos microorganismos. El aumento en el porcentaje de aislados productores de BLEE también ha ido asociado con una mayor diversidad de enzimas, la mayoría de tipo CTX-M. También se ha observado un incremento en el número de aislados procedentes de la comunidad, dónde las enzimas predominantes son CTX-M-14 y SHV-12. Caracterizar la epidemiología de estos aislados en múltiples niveles (estructura poblacional, plásmidos, entornos genéticos) permite tener un mejor conocimiento de la dispersión local de la resistencia antibiótica.

Dentro de este escenario, también se demuestra en esta tesis la importancia de *K. pneumoniae* en la epidemiología de BLEE. La compleja situación epidemiológica reflejada en este estudio, con pocos brotes, persistencia y emergencia de BLEE a lo largo del tiempo, transmisión de plásmidos y el aumento de aislados procedentes de la comunidad, debe ser tomada en cuenta a la hora de realizar estudios sobre la ecología de la resistencia y la mejora de medidas para el posible control de estos aislados.

## **CONCLUSIONES**



1. El aumento de la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE en el tracto intestinal de pacientes hospitalizados y de la comunidad reafirman la importancia este compartimento como reservorio para este tipo de microorganismos.
2. El aislamiento de clones productores de BLEE en pacientes con infecciones comunitarias y sus convivientes sugiere la transmisión de persona a persona de estos aislados, sin excluir la posibilidad de una fuente común.
3. La sobrerrepresentación de CTX-M-14 y SHV-12 en enterobacterias aisladas de portadores fecales hospitalizados y no hospitalizados refleja un cambio epidemiológico en el medio hospitalario debido probablemente a la expansión de enzimas del grupo CTX-M-9 y SHV en el ámbito comunitario.
4. El aumento de la prevalencia de aislados clonalmente no relacionados de *K. pneumoniae* productores de diferentes tipos de BLEE reflejaría la adquisición de plásmidos altamente transmisibles que parecen haber contribuido a la selección de esta población al conferir ventajas adaptativas derivadas de la adquisición de genes de resistencia o de su mejor capacidad de colonización.
5. La detección por primera vez en España de *bla*<sub>CTX-M-2</sub> prevalente en países latinoamericanos aumenta la diversidad de genes *bla*<sub>BLEE</sub> circulantes en nuestro entorno y subraya la importancia de la diseminación internacional de bacterias resistentes. La identificación del entorno genético de *bla*<sub>CTX-M-2</sub> constituye uno de los pocos ejemplos de integrones de clase 1 caracterizados en detalle y remarca el papel de Tn21 en la diseminación de estas plataformas.
6. La diseminación del gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> está asociada esencialmente a la dispersión de plásmidos IncK entre cepas uropatógenicas de *E. coli* de los grupos A, D y B1 con una sobrerrepresentación de determinados clones o secuencias tipo.
7. El análisis de los alelos *bla*<sub>CTX-M-14</sub> y las plataformas genéticas en las que se encuentran indicarían la existencia de diferentes eventos de movilización y la posible influencia del entorno genético en su diseminación. La expansión del gen *bla*<sub>CTX-M-14a</sub> entre cepas uropatógenicas de *E. coli* de los grupos A, D y B1 en nuestro entorno está



asociada esencialmente a plásmidos altamente transmisibles de tipo IncK cuyo sistema de conjugación favorece la colonización y la formación de biofilms de las cepas que lo contienen

8. La diseminación de *bla*<sub>SHV-12</sub> está asociada a su localización en plásmidos altamente transmisibles del grupo IncI con un alto poder de recombinación como refleja la presencia de cointegrados IncI-IncN. Sin embargo su asociación con plásmidos de distintos grupos indicaría que la recombinación homóloga entre plásmidos diferentes habría influido en la diseminación de este gen.

Los estudios de vigilancia epidemiológica en distintos compartimentos son necesarios para conocer los mecanismos de dispersión de los aislados productores de BLEE y diseñar medidas para el control de su diseminación. El escenario descrito es complejo, donde las epidemias por clones específicos, la diseminación y mantenimiento de plásmidos y la captura de genes por determinadas plataformas genéticas han contribuido en la evolución y endemia local de microorganismos productores de BLEE.

## **BIBLIOGRAFÍA**



- Ahmed AH, Nakano H, Shimamoto T.** Molecular characterization of integrons in non-typhoid *Salmonella* serovars isolated in Japan: description of an unusual class 2 integron. *J Antimicrob Chemother.* **2005**; 55: 371-4.
- Al-Obeid S, Bremont S, Jabri L, Massoudi N, Haddad Q.** *Klebsiella pneumoniae* LO10 producing extended-spectrum beta-lactamase SHV-12 in Saudi Arabia. *J Chemother.* **2008**; 20: 709-13.
- Alvarado A, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F.** Presented at the International Plasmid Biology Conference, Gdansk, Poland, August-September **2008**.
- Ambler RP.** The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **1980**; 289: 321-31.
- Ángel Díaz M, Ramón Hernández J, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A; Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH).** *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2009**; 27: 503-10.
- Araki Y, Inoue M, Mitsuhashi S.** Incompatibility group K plasmids in bacteria isolated from a urinary tract infection. *Microbiol Immunol.* **1983**; 27: 1-5.
- Arduino SM, Roy PH, Jacoby GA, Orman BE, Pineiro SA, Centron D.** *bla*CTX-M-2 is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**; 46: 2303-6.
- Arduino SM, Catalano M, Orman BE, Roy PH, Centron D.** Molecular epidemiology of orf513-bearing class 1 integrons in multiresistant clinical isolates from Argentinean hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* **2003**; 47: 3945-9.
- Arlet G, Rouveau M, Casin I, Bouvet PJ, Lagrange PH, Philippon A.** Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 beta-lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. *J Clin Microbiol.* **1994**; 32: 2553-8.
- Arpin C, Dubois V, Maugein J, Jullin J, Dutilh B, Brochet JP, Larribet G, Fischer I, Quentin C.** Clinical and molecular analysis of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteria in the community setting. *J Clin Microbiol.* **2005**; 43: 5048-54.
- Arpin C, Quentin C, Grobost F, Cambau E, Robert J, Dubois V, Coulange L, André C; Scientific Committee of ONERBA.** Nationwide survey of extended-spectrum {beta}-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the French community setting. *J Antimicrob Chemother.* **2009**; 63: 1205-14.
- Asensio A, Oliver A, González-Diego P, Baquero F, Pérez-Díaz JC, Ros P, Cobo J, Palacios M, Lasheras D, Cantón R.** Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Dis.* **2000**; 30: 55-60.
- Bae IK, Lee YN, Lee WG, Lee SH, Jeong SH.** Novel complex class 1 integron bearing an *ISCR1* element in an *Escherichia coli* isolate carrying the *bla*CTX-M-14 gene. *Antimicrob Agents Chemother.* **2007**; 51: 3017-9.
- Baquero F, Reguera JA, Ojeda M, Cantón R, Martínez JL, Martínez-Beltrán J, Martínez-Ferrer M.** *Escherichia coli* con resistencia a cefalosporinas de tercera generación codificadas por una  $\beta$ -lactamasa de tipo plasmídico: primer brote en España. *Rev Esp Microbiol Clin.* **1988**; 3: 581-582.
- Baquero F, Coque TM, Cantón R.** Allodemics. *Lancet Infect Dis.* **2002**; 2: 591-2.
- Baquero F, Hsueh PR, Paterson DL, Rossi F, Bochicchio GV, Gallagher G, Lantz K, Villasenor JB, McCarroll K, Abramson MA, Chow JW.** *In vitro* susceptibilities of aerobic and facultatively anaerobic gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: 2005 results from Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Surg Infect (Larchmt).* **2009**; 10: 99-104.
- Baraniak A, Izdebski R, Herda M, Fiett J, Hryniewicz W, Gniadkowski M, Kern-Zdanowicz I, Filczak K, Lopaciuk U.** Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**; 53: 4565-7.

- Barlow M, Reik RA, Jacobs SD, Medina M, Meyer MP, McGowan JE, Jr, Tenover FC.** High rate of mobilization for *bla*CTX-Ms. *Emerg Infect Dis.* **2008**; 14: 423-8.
- Barthélémy M, Peduzzi J, Labia R.** Distinction between the primary structures of TEM-1 and TEM-2 beta-lactamases. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* **1985**; 136A: 311-21
- Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ.** A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem.* **1995**; 226: 235-40.
- Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S.** A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection.* **1990**; 18: 294-8.
- Bauernfeind A, Casellas JM, Goldberg M, Holley M, Jungwirth R, Mangold P, Röhnisch T, Schweighart S, Wilhelm R.** A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection.* **1992**; 20: 158-63.
- Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalin E, Anđ O, Bal C, Casellas JM.** Characterization of beta-lactamase gene *bla*PER-2, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* **1996**; 40: 616-20.
- Ben-Ami R, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D, Giladi M, Chmelnitsky I, Leavitt A, Carmeli Y.** Influx of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae into the hospital. *Clin Infect Dis.* **2006**; 42: 925-34.
- Ben-Ami R, Rodríguez-Baño J, Arslan H, Pitout JD, Quentin C, Calbo ES, Azap OK, Arpin C, Pascual A, Livermore DM, Garau J, Carmeli Y.** A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in nonhospitalized patients. *Clin Infect Dis.* **2009**; 49: 682-90.
- Ben-Hamouda T, Foulon T, Ben-Mahrez K.** Involvement of SHV-12 and SHV-2a encoding plasmids in outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. *Microb Drug Resist.* **2004**; 10: 132-8.
- Biendo M, Thomas D, Laurans G, Hammad-Daoudi F, Canarelli B, Rousseau F, Castelain S, Eb F.** Molecular diversity of *Proteus mirabilis* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases in a French university hospital. *Clin Microbiol Infect.* **2005**; 11: 395-401.
- Biendo M, Canarelli B, Thomas D, Rousseau F, Hammad F, Adjide C, Laurans G, Eb F.** Successive emergence of extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacter aerogenes* isolates in a university hospital. *J Clin Microbiol.* **2008**; 46: 1037-44.
- Binh CT, Heuer H, Kaupenjohann M, Smalla K.** Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids. *FEMS Microbiol Ecol.* **2008**; 66: 25-37.
- Birnboim HC, Doly J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research.* **1979**; 7: 1513-23.
- Bischoff, KM, White DG, Hume ME, Poole TL, Nisbet DJ.** The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* **2005**; 243: 285-91.
- Blanco M, Alonso MP, Nicolas-Chanoine MH, Dahbi G, Mora A, Blanco JE, López C, Cortés P, Llagostera M, Leflon-Guibout V, Puentes B, Mamani R, Herrera A, Coira MA, García-Garrote F, Pita JM, Blanco J.** Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* **2009**; 63: 1135-41.
- Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, Deplano A, Vanhoof R, De Mendonca R, Rodríguez-Villalobos H, Struelens M, Glupczynski Y.** Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother.* **2007**; 59: 459-64.

- Bonnet R, Sampaio JL, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, Sirot J (2).** A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* **2000a**; 44: 1936-42.
- Bonnet R, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Viallard JL, Labia R, Sirot J .** A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* **2000b**; 44: 3061-8.
- Boyd D, Cloeckeaert A, Chaslus-Dancla E, Mulvey MR.** Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**; 46: 17314-22.
- Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGeer A, Muller MP, Willey BM, Bryce E, Gardam M, Nordmann P, Mulvey MR.** Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**; 48: 3758-64.
- Bradford PA.** Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* **2001**; 14: 933-51.
- Briñas L, Lantero M, Zarazaga M, Pérez F, Torres C.** Outbreak of SHV-5 beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal-pediatric intensive care unit in Spain. *Microb Drug Resist.* **2004**; 10: 354-8.
- Briñas L, Lantero M, de Diego I, Alvarez M, Zarazaga M, Torres C.** Mechanisms of resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* isolates recovered in a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother.* **2005a**; 56: 1107-10.
- Briñas L, Moreno MA, Teshager T, Sáenz Y, Porrero MC, Domínguez L, Torres C.** Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005b**; 49: 1262-4.
- Brisse S, van Himbergen T, Kusters K, Verhoef J.** Development of a rapid identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. *Clin Microbiol Infect.* **2004**; 10: 942-5.
- Brisse S, Duijkeren E.** Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. *Vet Microbiol.* **2005**; 105: 307-12.
- Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, Grimont P.** Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One.* **2009**; 4: e4982.
- Brown H, Stokes H, Hall R.** The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives. *J. Bacteriol.* **1996**; 178: 4429-37.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* **1995**; 39: 1211-33.
- Bush K, Jacoby GA.** Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **2010**; 54: 969-76.
- Cagnacci S, Gualco L, Debbia E, Schito GC, Marchese A.** European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25:H4-ST 131 and O15:K52:H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis. *J Clin Microbiol.* **2008a**; 46: 2605-12.
- Cagnacci S, Gualco L, Roveta S, Mannelli S, Borgianni L, Docquier JD, Dodi F, Centanaro M, Debbia E, Marchese A, Rossolini GM.** Bloodstream infections caused by multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing the carbapenem-hydrolysing VIM-1 metallo-beta-lactamase: first Italian outbreak. *J Antimicrob Chemother.* **2008b**; 61: 296-300.

- Cantón R.** Tesis Doctoral. Beta-lactamasas plasmídicas de espectro ampliado en Enterobacteriaceae. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid. **1994**.
- Cantón R, Oliver A, Coque TM, Varela M del C, Pérez-Díaz JC, Baquero F.** Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacter isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol.* **2002**; 40: 1237-43.
- Cantón R, Coque TM.** The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* **2006**; 9: 466-75
- Cantón R, Valverde A, Novais A, Baquero F, Coque TM.** Evolución y panorama actual de las BLEE. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2007**; 25 (Supl 2): 2-10.
- Cantón R.** Epidemiology and evolution of beta-lactamasas. En: *Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens*. Baquero F, Nombela C, Cassell GH, Gutiérrez-Fuentes JA (eds). **2008a**; ASM Press, Washington D.C. pp. 249-270.
- Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM.** Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* **2008b**; 14 (Supl 1): 144-53.
- Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ.** Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* **2005**; 63: 219-28.
- Carattoli A.** Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin Microbiol Infect.* **2008**; 14 (Supl 1): 117-23.
- Carattoli A.** Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**; 53: 2227-38.
- Carattoli A, Aschbacher R, March A, Larcher C, Livermore DM, Woodford N.** Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid pKOX105 encoding VIM-1, QnrS1 and SHV-12 proteins in Enterobacteriaceae from Bolzano, Italy compared with IncN plasmids encoding KPC enzymes in the USA. *J Antimicrob Chemother.* **2010**. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 2070-5.
- Carrër A, Lassel L, Fortineau N, Mansouri M, Anguel N, Richard C, Nordmann P.** Outbreak of CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* in the Intensive Care Unit of a French Hospital. *Microb Drug Resist.* **2009**; 15: 47-54.
- Cartelle M, Canle D, Llarena FJ, Molina F, Villanueva R, Bou G.** Characterisation of the first CTX-M-10-producing isolate of *Salmonella enterica* serotype Virchow. *Clin Microbiol Infect.* **2006**; 12: 285-7.
- Casewell MW, Phillips I.** Aspects of the plasmid-mediated antibiotic resistance and epidemiology of *Klebsiella* species. *Am J Med.* **1981**; 70: 459-62.
- Castillo García FJ, Seral García C, Pardos De la Gandara M, Millán Lou MI, Pitart Ferré C.** Prevalence of fecal carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae in hospitalized and ambulatory patients during two non-outbreak periods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2007**; 26: 77-8.
- Cattoir V, Nordmann P.** Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Curr Med Chem.* **2009**; 16: 1028-46.
- Cendejas E, Gómez-Gil R, Gómez-Sánchez P, Mingorance J.** Detection and characterization of Enterobacteriaceae producing metallo-beta-lactamasas in a tertiary-care hospital in Spain. *Clin Microbiol Infect.* **2010**; 16: 181-3.
- Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Xiong JH, Hawkey PM.** Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**; 46: 630-7.
- Chmelnitsky I, Carmeli Y, Leavitt A, Schwaber MJ, Navon-Venezia S.** CTX-M-2 and a new CTX-M-39 enzyme are the major extended-spectrum beta-lactamasas in multiple *Escherichia coli* clones isolated in Tel Aviv, Israel. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**; 49: 4745-50.
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E.** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* **2000**; 66:4555-8.

- Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI).** Performance and standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth informational supplement. Document M100-S20. **2010**. Wayne, PA.
- Coelho A, Mirelis B, Alonso-Tarrés C, Nieves Larrosa M, Miró E, Clivillé Abad R, Bartolomé RM, Castañer M, Prats G, Johnson JR, Navarro F, González-López JJ.** Detection of three stable genetic clones of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Barcelona metropolitan area, Spain. *J Antimicrob Chemother.* **2009**; 64: 862-4.
- Collis CM, Hall RM.** Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother.* **1995**; 39: 155-62.
- Coque TM, Oliver A, Perez-Diaz JC, Baquero F, Cantón R.** Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**; 46: 500-510.
- Coque TM, Baquero F, Canton R.** Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill.* **2008a**; 20: 13.
- Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, Baquero F, Cantón R, Nordmann P.** Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis.* **2008b**; 14: 195-200.
- Costa D, Poeta P, Briñas L, Sáenz Y, Rodrigues J, Torres C.** Detection of CTX-M-1 and TEM-52 beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. *J Antimicrob Chemother.* **2004**; 54:960-1.
- Costa D, Poeta P, Sáenz Y, Vinué L, Rojo-Bezares B, Jouini A, Zarazaga M, Rodrigues J, Torres C.** Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J Antimicrob Chemother.* **2006**; 58: 1311-2.
- Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK.** Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev.* **1988**; 52: 375-95.
- Crémet L, Caroff N, Dauvergne S, Reynaud A, Lepelletier D, Corvec S.** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL Enterobacteriaceae clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. *Pathol Biol.* **2009** May 28. En prensa.
- Cullik A, Pfeifer Y, Prager R, von Baum H, Witte W.** A novel IS26 structure surrounds *bla*CTX-M genes in different plasmids from German clinical *Escherichia coli* isolates. *J Med Microbiol.* **2010**; 59: 580-7.
- Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque TM, Cantón R.** Emergence of *bla*KPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J Antimicrob Chemother.* **2010**; 65: 1608-14.
- Dahmen S, Poirel L, Mansour W, Bouallègue O, Nordmann P.** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae from Tunisia. *Clin Microbiol Infect.* **2010**; 16: 1019-23.
- Damjanova I, Tóth A, Pászti J, Jakab M, Milch H, Bauernfeind A, Füzi M.** Epidemiology of SHV-type beta-lactamase-producing *Klebsiella* spp. from outbreaks in five geographically distant Hungarian neonatal intensive care units: widespread dissemination of epidemic R-plasmids. *Int J Antimicrob Agents.* **2007**; 29: 665-71.
- Damjanova I, Tóth A, Pászti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J, Milch H, Füzi M.** Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSA's'? *J Antimicrob Chemother.* **2008**; 62: 978-85.
- Datta N, Kontomichalou P.** Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature.* **1965**; 208: 239-41.



- Datta N, Hughes VM.** Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature*. **1983**; 306: 616-7.
- Decré D, Burghoffer B, Gautier V, Petit JC, Arlet G.** Outbreak of multi-resistant *Klebsiella oxytoca* involving strains with extended-spectrum beta-lactamases and strains with extended-spectrum activity of the chromosomal beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother*. **2004**; 54: 881-8.
- DeLappe N, O'Halloran F, Fanning S, Corbett-Feeney G, Cheasty T, Cormican M.** Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Shigella sonnei* isolates from Western Ireland, an area of low incidence of infection. *J Clin Microbiol*. **2003**; 41: 1919-24.
- Di Conza J, Ayala JA, Power P, Mollerach M, Gutkind G.** Novel class 1 integron (InS21) carrying *bla*CTX-M-2 in *Salmonella enterica* serovar infantis. *Antimicrob Agents Chemother*. **2002**; 46: 2257-61.
- Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S.** Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol*. **2005**; 43: 4178-82.
- Diestra K, Coque TM, Miró E, Oteo J, Nicolau CJ, Campos J, Moyá B, Curiao T, Pérez-Vázquez M, Cantón R, Oliver A, Navarro F; Red Española de Investigación en Patología Infecciosa.** Characterization and molecular epidemiology of ESBL in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in 11 Spanish hospitals (2004). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **2008**; 26: 404-10.
- Diestra K, Juan C, Curiao T, Moyá B, Miró E, Oteo J, Coque TM, Pérez-Vázquez M, Campos J, Cantón R, Oliver A, Navarro F; Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Spain.** Characterization of plasmids encoding *bla*ESBL and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. **2009**; 63: 60-6.
- Diestra K, Miró E, Martí C, Navarro D, Cuquet J, Coll P, Navarro F.** Multiclonal epidemic of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing DHA-1 in a Spanish hospital. *Clin Microbiol Infect*. **2010**. En prensa.
- Doi Y, Arakawa Y.** 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis*. **2007**; 45: 88-94.
- Dudley EG, Abe C, Ghigo JM, Latour-Lambert P, Hormazabal JC, Nataro JP.** An IncII plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. *Infect Immun*. **2006**; 74: 2102-14.
- EARSS Annual Report 2008.** <http://www.rivm.nl/earss/>
- Eckert, C, Gautier V, Arlet G.** DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*CTX-M genes. *J Antimicrob Chemother*. **2006**; 57: 14-23.
- Elhani D, Bakir L, Aouni M, Passet V, Arlet G, Brisse S, Weill FX.** Molecular epidemiology of extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a university hospital in Tunis, Tunisia 1999-2005. *Clin Microbiol Infect*. **2010**; 16: 157-64.
- Endimiani A, Depasquale JM, Forero S, Perez F, Hujer AM, Roberts-Pollack D, Fiorella PD, Pickens N, Kitchel B, Casiano-Colón AE, Tenover FC, Bonomo RA.** Emergence of *bla*KPC-containing *Klebsiella pneumoniae* in a long-term acute care hospital: a new challenge to our healthcare system. *J Antimicrob Chemother*. **2009**; 64: 1102-10.
- Escobar-Páramo P, Clermont O, Blanc-Potard AB, Bui H, Le Bouguénec C, Denamur E.** A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol*. **2004**; 21: 1085-94.
- Ewers C, Grobbel M, Stamm I, Kopp PA, Diehl I, Semmler T, Fruth A, Beutlich J, Guerra B, Wieler LH, Guenther S.** Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *J Antimicrob Chemother*. **2010**; 65: 651-60.
- Falagas ME, Bliziotis IA.** Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int J Antimicrob Agents*. **2007**; 29: 630-6.

- Feil EJ, Li B, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG.** eBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bact.* **2004**; 186: 1518-1530.
- Fernández-Rodríguez, A., J. Reguera, J. C. Pérez-Díaz, J. J. Picazo, and F. Baquero.** Primera epidemia española de resistencia plasmídica a cefalosporinas de tercera generación: implicación de SHV-2. *Enf Infec Med Clin.* **1992**; 10: 458-61.
- Fiett J, Palucha A, Miaczyńska B, Stankiewicz M, Przondo-Mordarska H, Hryniewicz W, Gniadkowski M.** A novel complex mutant beta-lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiellae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2000**; 44: 1499-505.
- Fluit AC, Schmitz FJ.** Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect.* **2004**; 10: 272-88.
- Ford PJ, Avison MB.** Evolutionary mapping of the SHV beta-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent *bla*SHV mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J Antimicrob Chemother.* **2004**; 54: 69-75.
- Friedmann R, Raveh D, Zartzer E, Rudensky B, Broide E, Attias D, Yinnon AM.** Prospective evaluation of colonization with extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing enterobacteriaceae among patients at hospital admission and of subsequent colonization with ESBL-producing enterobacteriaceae among patients during hospitalization. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **2009**; 30: 534-42.
- Froehlich B, Parkhill J, Sanders M, Quail MA, Scott JR.** The pCoo plasmid of enterotoxigenic *Escherichia coli* is a mosaic cointegrate. *J Bacteriol.* **2005**; 187: 6509-16.
- Galani I, Souli M, Koratzanis E, Chrysosouli Z, Giamarellou H.** Molecular characterization of an *Escherichia coli* clinical isolate that produces both metallo-beta-lactamase VIM-2 and extended-spectrum beta-lactamase GES-7: identification of the In8 integron carrying the *bla*VIM-2 gene. *J Antimicrob Chemother.* **2006**; 58: 432-3.
- Galimand M, Courvalin P, Lambert T.** Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother.* **2003**; 47: 2565-71.
- García A, Navarro F, Miró E, Mirelis B, Campoy S, Coll P.** Characterization of the highly variable region surrounding the *bla*(CTX-M-9) gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. *J Antimicrob Chemother.* **2005**; 56: 819-26.
- García San Miguel L, Cobo J, Valverde A, Coque TM, Diz S, Grill F, Cantón R.** Clinical variables associated with the isolation of *Klebsiella pneumoniae* expressing different extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* **2007**; 13: 532-8.
- Garcillán-Barcia MP, Francia MV, de la Cruz F.** The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev.* **2009**; 33: 657-87.
- Giraud-Morin C, Fosse T.** A seven-year survey of *Klebsiella pneumoniae* producing TEM-24 extended-spectrum beta-lactamase in Nice University Hospital (1994-2000). *J Hosp Infect.* **2003**; 54: 25-31.
- Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y; ReAct-Action on Antibiotic Resistance.** Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother.* **2008**; 52: 813-21.
- Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, Cantón R, Walsh TR.** Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother.* **2009**; 63: 1-4.
- Golebiewski M, Kern-Zdanowicz I, Zienkiewicz M, Adamczyk M, Zylinska J, Baraniak A, Gniadkowski M, Bardowski J, Ceglowski P.** Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum beta-lactamase gene

*bla*CTX-M-3. Antimicrob Agents Chemother. **2007**; 51: 3789-95.

**Gruteke P, Goessens W, Van Gils J, Peerbooms P, Lemmens-Den Toom N, Van Santen-Verheul M, Van Belkum A, Verbrugh H.** Patterns of resistance associated with integrons, the extended-spectrum beta-lactamase SHV-5 gene, and a multidrug efflux pump of *Klebsiella pneumoniae* causing a nosocomial outbreak. J Clin Microbiol. **2003**; 41: 1161-6.

**Haegman S, Löfdahl S, Paauw A, Verhoef J, Brisse S.** Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. **2004**; 48: 2400-8.

**Hall LM, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE.** OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. **1993**; 37: 1637-44.

**Hawkey PM.** Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamases in Asia. Clin Microbiol Infect. **2008**; 14 (Supl 1): 159-65.

**Hawkey PM, Jones AM.** The changing epidemiology of resistance. J Antimicrob Chemother. **2009**; 64 (Supl 1): i3-10.

**Heffernan HM, Woodhouse RE, Pope CE, Blackmore TK.** Prevalence and types of extended-spectrum beta-lactamases among urinary *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in New Zealand. Int J Antimicrob Agents. **2009**; 34: 544-9.

**Heffron F, Sublett R, Hedges RW, Jacob A, Falkow S.** Origin of the TEM-beta-lactamase gene found on plasmids. J Bacteriol. **1975**; 122: 250-6.

**Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A; Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH).** Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. Antimicrob Agents Chemother. **2005**; 49: 2122-5.

**Holländer R, Ebke M, Barck H, von Pritzbuier E.** Asymptomatic carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase by patients

in a neurological early rehabilitation unit: management of an outbreak. J Hosp Infect. **2001**; 48: 207-13.

**Ho PL, Poon WW, Loke SL, Leung MS, Chow KH, Wong RC, Yip KS, Lai EL, Tsang KW; COMBAT study group.** Community emergence of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamases among urinary *Escherichia coli* from women. J Antimicrob Chemother. **2007**; 60: 140-4.

**Hopkins KL, Liebana E, Villa L, Batchelor M, Threlfall EJ, Carattoli A.** Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. Antimicrob Agents Chemother. **2006**; 50: 3203-6.

**Hrabák J, Empel J, Bergerová T, Fajfrlík K, Urbásková P, Kern-Zdanowicz I, Hryniewicz W, Gniadkowski M.** International clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases in a Czech hospital. J Clin Microbiol. **2009**; 47: 3353-7.

**Huovinen S.** Rapid isoelectric focusing of plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases with Pharmacia PhastSystem. Antimicrob Agents Chemother. **1988**; 32: 1730-32.

**Ivanova D, Markovska R, Hadjieva N, Schneider I, Mitov I, Bauernfeind A.** Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Serratia marcescens* outbreak in a Bulgarian hospital. J Hosp Infect. **2008**; 70: 60-5.

**Jacoby GA.** Mechanisms of resistance to quinolones. Clin Infect Dis. **2005**; 41 (Supl 2): S120-6.

**Jarlier V, Nicolas M, Fournier G, Philippon A.** Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis. **1998**; 10: 867-78.

**Jauregui F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, Carboneille E, Lortholary O, Clermont O, Denamur E, Picard B, Nassif X, Brisse S.** Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. BMC Genomics. **2008**; 9:560.

- Jeong SH, Bae IK, Lee JH, Sohn SG, Kang GH, Jeon GJ, Kim YH, Jeong BC, Lee SH.** Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean nationwide survey. *J Clin Microbiol.* **2004**; 42: 2902-6.
- Johnson JR, Murray AC, Kuskowski MA, Schubert S, Prère MF, Picard B, Colodner R, Raz R; Trans-Global Initiative for Antimicrobial Resistance Initiative (TIARA) Investigators.** Distribution and characteristics of *Escherichia coli* clonal group A. *Emerg Infect Dis.* **2005**; 11:141-5.
- Jones LA, McIver CJ, Kim MJ, Rawlinson WD, White PA.** The *aadB* gene cassette is associated with *blaSHV* genes in *Klebsiella* species producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**; 49: 794-7.
- Jouini A, Vinué L, Slama KB, Sáenz Y, Klibi N, Hammami S, Boudabous A, Torres C.** Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *J Antimicrob Chemother.* **2007**; 60: 1137-41.
- Juan Nicolau C, Oliver A.** Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2010**; 28 Supl 1:19-28
- Kader AA, Kumar A, Kamath KA.** Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in patients and asymptomatic healthy individuals. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **2007**; 28: 1114-6.
- Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P.** Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence *ISEcp1*. *FEMS Microbiol Lett.* **2001**; 201: 237-41.
- Kariuki S, Revathi G, Corkill J, Kiiru J, Mwituria J, Mirza N, Hart CA.** *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections resistant to fluoroquinolones and extended-spectrum beta-lactams. *J Infect Dev Ctries.* **2007**; 1: 257-62.
- Kassis-Chikhani N, Decré D, Gautier V, Burghoffer B, Saliba F, Mathieu D, Samuel D, Castaing D, Petit JC, Dussaix E, Arlet G.** First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *blaVIM-1* and *blaSHV-5* in a French university hospital. *J Antimicrob Chemother.* **2006**; 57: 142-5.
- Kassis-Chikhani N, Decré D, Ichai P, Sengelin C, Geneste D, Mihaila L, Dussaix E, Arlet G.** Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 and SHV-12 in a French hospital. *J Antimicrob Chemother.* **2010**; 65: 1539-40.
- Katsandri A, Avlamis A, Vasilakopoulou A, Mela V, Kosmidis C, Papaparaskevas J, Petrikos GL.** Risk factors for coexistence of fluoroquinolone resistance and ESBL production among Enterobacteriaceae in a Greek university hospital. *J Chemother.* **2008**; 20: 452-7.
- Kaufmann, M.E.** Pulse-field gel electrophoresis. En *Methods in Molecular Medicine*, vol 15: *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications*. Woodford N and Johnson AP (eds). **1998**. Humana Press Inc, Totowa, NJ. pp. 17-31.
- Keynan Y, Rubinstein E.** The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. *Int J Antimicrob Agents.* **2007**; 30: 385-9.
- Kim J, Shin HS, Seol SY, Cho DT.** Relationship between *blaSHV-12* and *blaSHV-2a* in Korea. *J Antimicrob Chemother.* **2002**; 49: 261-7.
- Kim JY, Lautenbach E, Chu J, Goyal M, Nachamkin I, McGowan K, Coffin S, Zaoutis T.** Fluoroquinolone resistance in pediatric bloodstream infections because of *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. *Am J Infect Control.* **2008**; 36: 70-3.
- Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P.** Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand,

where the CTX-M family is endemic. *Antimicrob Agents Chemother.* **2008**; 52: 2818-24.

**Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Brolund A, Giske CG.** Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**; 53:3365-70.

**Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S.** Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* **1983**; 11: 315-7.

**Kojima A, Ishii Y, Ishihara K, Esaki H, Asai T, Oda C, Tamura Y, Takahashi T, Yamaguchi K.** Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**; 49: 3533-7

**Koksai F, Ak K, Kucukbasmaci O, Samasti M.** Prevalence and antimicrobial resistance patterns of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures in an Istanbul University Hospital. *Chemotherapy.* **2009**; 55: 293-7.

**Kontopoulou K, Protonotariou E, Vasilakos K, Kriti M, Koteli A, Antoniadou E, Sofianou D.** Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase resistant to colistin. *J Hosp Infect.* **2010**; 76: 70-3.

**Kumar S, Tamura K, Nei M.** MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* **2004**; 5: 150-63.

**Laraki N, Galleni M, Thamm I, Riccio ML, Amicosante G, Frère JM, Rossolini GM.** Structure of In31, a *bla*<sub>IMP</sub>-containing *Pseudomonas aeruginosa* integron phylogenically related to In5, which carries an

unusual array of gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother.* **1999**; 43: 890-901.

**Lartigue MF, Poirel L, Nordmann P.** Diversity of genetic environment of *bla*(CTX-M) genes. *FEMS Microbiol Lett.* **2004**; 234: 201-7.

**Lartigue MF, Fortineau N, Nordmann P.** Spread of novel expanded-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae in a university hospital in the Paris area, France. *Clin Microbiol Infect.* **2005**; 11: 588-91.

**Lau SH, Kaufmann ME, Livermore DM, Woodford N, Willshaw GA, Cheasty T, Stamper K, Reddy S, Cheesbrough J, Bolton FJ, Fox AJ, Upton M.** UK epidemic *Escherichia coli* strains A-E, with CTX-M-15 beta-lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone. *J Antimicrob Chemother.* **2008a**; 62: 1241-4.

**Lau SH, Reddy S, Cheesbrough J, Bolton FJ, Willshaw G, Cheasty T, Fox AJ, Upton M.** Major uropathogenic *Escherichia coli* strain isolated in the northwest of England identified by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol.* **2008b**; 46: 1076-80.

**Laurent C, Rodriguez-Villalobos H, Rost F, Strale H, Vincent JL, Deplano A, Struelens MJ, Byl B.** Intensive care unit outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* controlled by cohorting patients and reinforcing infection control measures. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **2008**; 29: 517-24.

**Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, Patel JB, Edelstein PH, Fishman NO.** Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Infect Dis.* **2001**; 33: 1288-94.

**Lavigne JP, Bouziges N, Chanal C, Mahamat A, Michaux-Charachon S, Sotto A.** Molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases in a French hospital. *J Clin Microbiol.* **2004**; 42: 3805-8.

- Lavilla S, González-López JJ, Miró E, Domínguez A, Llagostera M, Bartolomé RM, Mirelis B, Navarro F, Prats G.** Dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria: the food-borne outbreak lesson. *J Antimicrob Chemother.* **2008a**; 61: 1244-51.
- Lavilla S, González-López JJ, Sabaté M, García-Fernández A, Larrosa MN, Bartolomé RM, Carattoli A, Prats G.** Prevalence of qnr genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother.* **2008b**; 61: 291-5.
- Lee KM, Yoo JI, Yoo YS, Yoo JS, Chung GT, Ahn TI, Lee YS.** Investigation of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing SHV-12 and SHV-11 beta-lactamases in Korean hospitals. *J Microbiol Biotechnol.* **2009**; 19: 1065-9.
- Leflon-Guibout V, Blanco J, Amaqdouf K, Mora A, Guize L, Nicolas-Chanoine MH.** Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, among fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area of Paris, France. *J Clin Microbiol.* **2008**; 46: 3900-5.
- Lescat M, Calteau A, Hoede C, Barbe V, Touchon M, Rocha E, Tenaillon O, Médigue C, Johnson JR, Denamur E.** A module located at a chromosomal integration hot spot is responsible for the multidrug resistance of a reference strain from *Escherichia coli* clonal group A. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**; 53: 2283-8.
- Lévesque C, Brassard S, Lapointe J, Roy PH.** Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several integrons. *Gene.* **1994**; 142: 49-54.
- Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH.** PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* **1995**; 39: 185-91.
- Leyton DL, Sloan J, Hill RE, Doughty S, Hartland EL.** Transfer region of pO113 from enterohemorrhagic *Escherichia coli*: similarity with R64 and identification of a novel plasmid-encoded autotransporter, EpeA. *Infect Immun.* **2003**; 71: 6307-19.
- Liebana E, Batchelor M, Hopkins KL, Clifton-Hadley FA, Teale CJ, Foster A, Barker L, Threlfall EJ, Davies RH.** Longitudinal farm study of extended-spectrum-beta-lactamase-mediated resistance. *J Clin Microbiol.* **2006**; 44: 1630-4.
- Liebert CA, Wireman J, Smith T, Summers AO.** Phylogeny of mercury resistance (mer) operons of gram negative bacteria isolated from the fecal flora of primates. *Appl Environ Microbiol.* **1997**; 63: 1066-76.
- Liebert CA, Hall RM, Summers AO.** Transposon Tn2I, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev.* **1999**; 63: 507-22.
- Literacka E, Bedenic B, Baraniak A, Fiett J, Tonkic M, Jajic-Bencic I, Gniadkowski M.** blaCTX-M genes in *Escherichia coli* strains from Croatian Hospitals are located in new (blaCTX-M-3a) and widely spread (blaCTX-M-3a and blaCTX-M-15) genetic structures. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**; 53: 1630-5.
- Liu SL, Hessel A, Sanderson KE.** Genomic mapping with I-CeuI, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1993**; 15: 6874-8.
- Livermore DM.**  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **1995**; 8: 557-84.
- Luzzaro F, Mezzatesta M, Mugnaioli C, Perilli M, Stefani S, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A.** Trends in production of extended-spectrum beta-lactamases among enterobacteria of medical interest: report of the second Italian nationwide survey. *J Clin Microbiol.* **2006**; 44: 1659-64.
- Lytsy B, Sandegren L, Tano E, Torell E, Andersson DI, Melhus A.** The first major extended-spectrum beta-lactamase outbreak in Scandinavia was caused by clonal spread of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-15. *APMIS.* **2008**; 116: 302-8.

- Mabilat C, Goussard S.** PCR detection and identification of genes for extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. In *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications*. **1995**; 553-7. ASM Press. Washington, DC.
- Machado E, Cantón R, Baquero F, Galán JC, Rollán A, Peixe L, Coque TM.** Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. **2005**; 49: 1823-9.
- Machado E, Ferreira J, Novais A, Peixe L, Cantón R, Baquero F, Coque TM.** Preservation of integron types among Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases in a Spanish hospital over a 15-year period (1988 to 2003). *Antimicrob Agents Chemother*. **2007**; 51: 2201-4.
- Machado E, Coque TM, Cantón R, Sousa JC, Silva D, Ramos M, Rocha J, Ferreira H, Peixe L.** Leakage into Portuguese aquatic environments of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. **2009**; 63: 616-8.
- Manges AR, Tabor H, Tellis P, Vincent C, Tellier PP.** Endemic and epidemic lineages of *Escherichia coli* that cause urinary tract infections. *Emerg Infect Dis*. **2008**; 10 : 1575-83.
- Marcadé G, Deschamps C, Boyd A, Gautier V, Picard B, Branger C, Denamur E, Arlet G.** Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. **2009**; 63: 67-71.
- Martínez-Martínez L.** Asociación de BLEE con otros mecanismos de resistencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **2007**; 25 (Supl 2): 38-47.
- Martínez-Martínez L.** Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect*. **2008**; 14 Supl 1: 82-9.
- Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y.** Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. **1988**; 32:1243-6.
- Matsumoto Y, Inoue M.** Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A  $\beta$ -lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*. **1999**; 43: 307-13.
- Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J.** Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel aad gene. *Antimicrob Agents Chemother*. **2000**; 44: 1568-74.
- Mendonça N, Ferreira E, Louro D; ARSIP Participants, Caniça M.** Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended- and broad-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Portugal. *Int J Antimicrob Agents*. **2009**; 34: 29-37.
- Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortés P, González JJ, Lavilla S, Miró E, Muniesa M, Saco M, Tórtola MT, Mirelis B, Coll P, Llagostera M, Prats G, Navarro F.** Extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother*. **2006**; 58: 211-5.
- Mesko Meglic K, Koren S, Palepou MF, Karisik E, Livermore DM, Pike R, Andlovic A, Jeverica S, Krizan-Hergouth V, Müller-Premru M, Seme K; Slovenian ESBL Study Group, Woodford N.** Nationwide survey of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases among *Klebsiella pneumoniae* isolates in Slovenian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. **2009**; 53: 287-91.
- Minarini LA, Camargo IL, Pitondo-Silva A, Darini AL.** Multilocus sequence typing of uropathogenic ESBL-producing *Escherichia coli* isolated in a Brazilian community. *Curr Microbiol*. **2007**; 55: 524-9.
- Minarini LA, Clímaco EC, Guimarães DB, Ferreira JC, Palazzo IC, Martinez R, Darini AL.** Clonal transmission of ESBL-producing *Klebsiella* spp. at a university hospital in Brazil. *Curr Microbiol*. **2008**; 56:587-91.

- Miró E, Mirelis B, Navarro F, Rivera A, Mesa RJ, Roig MC, Gómez L, Coll P.** Surveillance of extended-spectrum beta-lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother.* **2005**; 56: 1152-5.
- Moodley A, Guardabassi L.** Transmission of IncN plasmids carrying *bla*CTX-M-1 between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**; 53: 1709-11.
- Morosini MI, Blázquez J, Negri MC, Cantón R, Loza E, Baquero F.** Characterization of a nosocomial outbreak involving an epidemic plasmid encoding for TEM-27 in *Salmonella enterica* subspecies enterica serotype Othmarschen. *J Infect Dis.* **1996**; 174: 1015-20.
- Morosini MI, García-Castillo M, Coque TM, Valverde A, Novais A, Loza E, Baquero F, Cantón R.** Antibiotic coresistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and in vitro activity of tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother.* **2006**; 50: 2695-9.
- Moubareck C, Daoud Z, Hakimé NI, Hamzé M, Mangeney N, Matta H, Mokhbat JE, Rohban R, Sarkis DK, Doucet-Populaire F.** Countrywide spread of community and hospital-acquired extended-spectrum beta-lactamase-(CTX-M-15)-producing *Enterobacteriaceae* in Lebanon. *J Clin Microbiol.* **2005**; 43: 3309-13.
- Moura A, Henriques I, Smalla K, Correia A.** Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res Microbiol.* **2010**; 161: 58-66.
- Muzaheed, Doi Y, Adams-Haduch JM, Shivannavar CT, Paterson DL, Gaddad SM.** Faecal carriage of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in patients with acute gastroenteritis. *Indian J Med Res.* **2009**; 129: 599-602.
- Naas T, Aubert D, Lambert T, Nordmann P.** Complex genetic structures with repeated elements, a *sul*-type class 1 integron, and the *bla*VEB extended-spectrum beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother.* **2006**; 50: 1745-52.
- Naas T, Poirel L, Nordmann P.** Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* **2008**; 14 (Supl 1): 42-52.
- Naseer U, Natås OB, Haldorsen BC, Bue B, Grundt H, Walsh TR, Sundsfjord A.** Nosocomial outbreak of CTX-M-15-producing *E. coli* in Norway. *APMIS.* **2007**; 115: 120-6.
- Navarro F, Mesa RJ, Miró E, Gomez L, Mirelis B, Coll P.** Evidence for convergent evolution of CTX-M-14 ESBL in *Escherichia coli* and its prevalence. *FEMS Microbiol Lett.* **2007a**; 273: 120-3.
- Navarro F, Miró E.** Entorno genético de las BLEE: implicaciones en la transmisión. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2007b**; 25 (Supl 2): 11-7.
- Nicolas-Chanoine MH, Jarlier V; 'La Collégiale de Bactériologie-Virologie-Hygiène Hospitalière de l'Assistance Publique, Hôpitaux de Paris, France.** Extended-spectrum beta-lactamases in long-term-care facilities. *Clin Microbiol Infect.* **2008a**; 14 (Supl 1): 111-6.
- Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, Park YJ, Lavigne JP, Pitout J, Johnson JR.** Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* **2008b**; 61: 273-81.
- Noguchi N, Katayama J, Sasatsu M.** A transposon carrying the gene *mphB* for macrolides 2'-phosphotransferase II. *FEMS Microbiol Lett.* **2000**; 192: 175-8.
- Nordmann P, Poirel L.** Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* **2005**; 56: 463-9.
- Novais A, Cantón R, Valverde A, Machado E, Galán JC, Peixe L, Carattoli A, Baquero F, Coque TM.** Dissemination and persistence of *bla*CTX-M-9 are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in



early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1-alpha, and IncFI groups. *Antimicrob Agents Chemother.* **2006**; 50: 2741-50.

**Novais A, Cantón R, Moreira R, Peixe L, Baquero F, Coque TM.** Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* **2007**; 51: 796-9.

**Novais A, Baquero F, Machado E, Cantón R, Peixe L, Coque TM.** International spread and persistence of TEM-24 is caused by the confluence of highly-penetrating *Enterobacteriaceae* clones and an IncA/C2 plasmid containing Tn1696::TnI and IS5075-Tn21. *Antimicrob Agents Chemother.* **2010**; 54: 825-34.

**Oliver A, Pérez-Díaz JC, Coque TM, Baquero F, Cantón R.** Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001**; 45: 616-20.

**Oliver A, Coque TM, Alonso D, Valverde A, Baquero F, Cantón R.** CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among *Enterobacteriaceae* in a Spanish hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**; 49: 1567-71.

**Olson AB, Silverman M, Boyd DA, McGeer A, Willey BM, Pong-Porter V, Daneman N, Mulvey MR.** Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**; 49: 2112-5.

**Oshima K, Toh H, Ogura Y, Sasamoto H, Morita H, Park SH, Ooka T, Iyoda S, Taylor TD, Hayashi T, Itoh K, Hattori M.** Complete genome sequence and comparative analysis of the wild-type commensal *Escherichia coli* strain SE11 isolated from a healthy adult. *DNA Res.* **2008**; 15: 375-86.

**Osterblad M, Kirveskari J, Koskela S, Tissari P, Vuorenoja K, Hakanen AJ, Vaara M, Jalava J.** First isolations of KPC-2-carrying ST258 *Klebsiella*

*pneumoniae* strains in Finland, June and August 2009. *Euro Surveill.* **2009**; 14. pii: 19349.

**Oteo J, Navarro C, Cercenado E, Delgado-Iribarren A, Wilhelmi I, Orden B, García C, Miguelañez S, Pérez-Vázquez M, García-Cobos S, Aracil B, Bautista V, Campos J.** Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol.* **2006**; 44: 2359-66.

**Oteo J, Garduño E, Bautista V, Cuevas O, Campos J; Spanish members of European Antimicrobial Resistance Surveillance System.** Antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Spain: analyses of 718 invasive isolates from 35 hospitals and report of one outbreak caused by an SHV-12-producing strain. *J Antimicrob Chemother.* **2008**; 61: 222-4.

**Oteo J, Orden B, Bautista V, Cuevas O, Arroyo M, Martínez-Ruiz R, Pérez-Vázquez M, Alcaraz M, García-Cobos S, Campos J.** CTX-M-15-producing urinary *Escherichia coli* O25b-ST131-phylogroup B2 has acquired resistance to fosfomycin. *J Antimicrob Chemother.* **2009a**; 64: 712-7.

**Oteo J, Diestra K, Juan C, Bautista V, Novais A, Pérez-Vázquez M, Moyá B, Miró E, Coque TM, Oliver A, Cantón R, Navarro F, Campos J; Spanish Network in Infectious Pathology Project (REIPI).** Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *Int J Antimicrob Agents.* **2009b**; 34: 173-6.

**Oteo J, Cuevas O, López-Rodríguez I, Banderas-Florido A, Vindel A, Pérez-Vázquez M, Bautista V, Arroyo M, García-Caballero J, Marín-Casanova P, González-Sanz R, Fuentes-Gómez V, Oña-Compán S, García-Cobos S, Campos J.** Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *J Antimicrob Chemother.* **2009c**; 64: 524-8

- Paauw A, Verhoef J, Fluit AC, Blok HE, Hopmans TE, Troelstra A, Leverstein-van Hall MA.** Failure to control an outbreak of qnrA1-positive multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* infection despite adequate implementation of recommended infection control measures. *J Clin Microbiol.* **2007**; 45: 1420-5.
- Pagani L, Perilli M, Migliavacca R, Luzzaro F, Amicosante G.** Extended-spectrum TEM- and SHV-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains causing outbreaks in intensive care units in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2000**; 19: 765-72.
- Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, Mantella A, Di Maggio T, Gamboa H, Gotuzzo E, Kronvall G, Paradisi F, Rossolini GM.** Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* **2007**; 51: 2720-5.
- Paniagua R, Valverde A, Coque TM, Baquero F, Cantón R.** Assessment of prevalence and changing epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae fecal carriers using a chromogenic medium. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2010**; 67: 376-9.
- Partridge S, Brown H, Stokes H, Hall R.** Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001a**; 45: 1263-70.
- Partridge S, Recchia G, Stokes HW, Hall R.** Family of class 1 integrons related to In4 from Tn1696. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001b**; 45: 3014-20.
- Partridge S, Brown H, Hall R.** Characterization and movement of the class 1 integron known as Tn2521 and Tn1405. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002a**; 46: 1288-94.
- Partridge S, Collis C, Hall R.** Class 1 integron containing a new cassette, *aadA10*, associated to Tn1404 from R151. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002b**; 46: 2400-8.
- Partridge S, Hall R.** In34, a complex In5 family class 1 integron containing *orf513* and *dfrA10*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2003**; 47: 342-9.
- Partridge SR, Hall RM.** Evolution of transposons containing *blaTEM* genes. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005a**; 49: 1267-8.
- Partridge S, Hall R.** Correctly identifying the streptothricin resistance gene cassette. *J Clin Microbiol.* **2005b**; 43: 4298-300.
- Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, Bonomo RA; International Klebsiella Study Group.** Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **2003**; 47: 3554-60.
- Paterson DL, Bonomo RA.** Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* **2005**; 18: 657-86.
- Paterson DL.** Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. *Am J Med.* **2006**; 119 (Supl 1): S20-8.
- Paulin-Curlee GG, Singer RS, Sreevatsan S, Isaacson R, Reneau J, Foster D, Bey R.** Genetic diversity of mastitis-associated *Klebsiella pneumoniae* in dairy cows. *J Dairy Sci.* **2007**; 90: 3681-9.
- Peña C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Liñares J, Ariza J, Gudiol F.** Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **1998**; 42: 53-8.
- Peña C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallarés R, Liñares J, Ariza J, Gudiol F.** An outbreak of hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia, including strains producing extended-spectrum beta-lactamase. *J Hosp Infect.* **2001**; 47: 53-9.
- Peña C, Gudiol C, Tubau F, Saballs M, Pujol M, Dominguez MA, Calatayud L, Ariza J, Gudiol F.** Risk-factors for acquisition of extended-spectrum beta-

lactamase-producing *Escherichia coli* among hospitalised patients. Clin Microbiol Infect. **2006**; 12: 279-84.

**Philippon A, Labia R, Jacoby G.** Extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. **1989**; 33: 1131-6.

**Piersigilli AL, Enrico MC, Bongiovanni ME, Bilbao LE, Martínez G, Ledesma EM.** Clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* producers of extended spectrum beta-lactamases at a private institution in Cordoba. Rev Chilena Infectol. **2009**; 26: 331-5.

**Pitondo-Silva A, Minarini LA, Camargo IL, Darini AL.** Clonal relationships determined by multilocus sequence typing among enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in Brazil. Can J Microbiol. **2009**; 55: 672-9.

**Pitout JD, Gregson DB, Church DL, Elsayed S, Laupland KB.** Community-wide outbreaks of clonally related CTX-M-14 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the Calgary health region. J Clin Microbiol. **2005a**; 43: 2844-9.

**Pitout JD, Laupland KB, Church DL, Menard ML, Johnson JR.** Virulence factors of *Escherichia coli* isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. **2005b**; 49: 4667-70.

**Pitout JD, Laupland KB.** Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis. **2008**; 8: 159-66.

**Pitout JD, Gregson DB, Campbell L, Laupland KB.** Molecular characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates causing bacteremia in the Calgary Health Region from 2000 to 2007: emergence of clone ST131 as a cause of community-acquired infections. Antimicrob Agents Chemother. **2009**; 53: 2846-51.

**Podschn R, Ullmann U.** *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. **1998**; 11: 589-603.

**Poeta P, Radhouani H, Pinto L, Martinho A, Rego V, Rodrigues R, Gonçalves A, Rodrigues J, Estepa V, Torres C, Igrejas G.** Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups. J Basic Microbiol. **2009**; 49: 584-8.

**Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P.** Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. Antimicrob Agents Chemother. **1999**; 43: 573-81.

**Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P.** Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. **2000**; 44: 622-32.

**Poirel L, Gerome P, De Champs C, Stephanazzi J, Naas T, Nordmann P.** Integron-located oxa-32 gene cassette encoding an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. **2002**; 46: 566-9.

**Poirel L, Decousser JW, Nordmann P.** Insertion sequence ISEcpIB is involved in expression and mobilization of a bla(CTX-M) beta-lactamase gene. Antimicrob Agents Chemother. **2003**; 47: 2938-45.

**Poirel L, Brinas L, Verlinde A, Ide L, Nordmann P.** BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, and the class 1 integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. **2005**; 49: 3743-8.

**Power P, Galleni M, Di Conza J, Ayala JA, Gutkind G.** Description of In116, the first blaCTX-M-2-containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina. J Antimicrob Chemother. **2005**; 55: 461-5.

**Prado T, Pereira WC, Silva DM, Seki LM, Carvalho AP, Asensi MD.** Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents

and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett Appl Microbiol.* **2008**; 46: 136-41.

**Prats G, Mirelis B, Miró E, Navarro F, Llovet T, Johnson JR, Camps N, Domínguez A, Salleras L.** Cephalosporin-resistant *Escherichia coli* among summer camp attendees with salmonellosis. *Emerg Infect Dis.* **2003**; 9: 1273-80.

**Psichogiou M, Tassios PT, Avlami A, Stefanou I, Kosmidis C, Platsouka E, Paniara O, Xanthaki A, Toutouza M, Daikos GL, Tzouveleakis LS.** Ongoing epidemic of blaVIM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey. *J Antimicrob Chemother.* **2008**; 61: 59-63.

**Queenan AM, Bush K.** Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* **2007**; 20:440-58.

**Rasheed JK, Jay C, Metchock B, Berkowitz F, Weigel L, Crellin J, Steward C, Hill B, Medeiros AA, Tenover FC.** Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother.* **1997**; 41: 647-53.

**Riaño I, García-Campello M, Sáenz Y, Alvarez P, Vinué L, Lantero M, Moreno MA, Zarazaga M, Torres C.** Occurrence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* in northern Spain with evidence of CTX-M-9 clonal spread among animals and humans. *Clin Microbiol Infect.* **2009**; 15: 292-5.

**Reinert RR, Low DE, Rossi F, Zhang X, Wattal C, Dowzicky MJ.** Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. *J Antimicrob Chemother.* **2007**; 60: 1018-29.

**Rodríguez I, Barownick W, Helmuth R, Mendoza MC, Rodicio MR, Schroeter A, Guerra B.** Extended-spectrum beta-lactamases and AmpC beta-lactamases in ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003-07. *J Antimicrob Chemother.* **2009**; 64: 301-9.

**Rodríguez MM, Power P, Radice M, Vay C, Famiglietti A, Galleni M, Ayala JA, Gutkind G.** Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**; 48: 4895-7.

**Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ, Pérez-Cano R, Pascual A.** Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol.* **2004**; 42: 1089-94.

**Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Muniain MA, Perea EJ, Pérez-Cano R, Hernández JR, Pascual A.** Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: implications for control. *Clin Infect Dis.* **2006**; 42: 37-45.

**Rodríguez-Baño J, Navarro MD.** Extended-spectrum beta-lactamases in ambulatory care: a clinical perspective. *Clin Microbiol Infect.* **2008a**; 14 (Supl 1):104-10.

**Rodríguez-Baño J, Alcalá JC, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, Horcajada JP, Tórtola T, Mirelis B, Navarro G, Cuenca M, Esteve M, Peña C, Llanos AC, Cantón R, Pascual A.** Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med.* **2008b**; 168: 1897-902.

**Rodríguez-Baño J, López-Cerero L, Navarro MD, Díaz de Alba P, Pascual A.** Faecal carriage of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemother.* **2008c**; 62: 1142-9.

**Rodríguez-Baño J, Alcalá J, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, Horcajada JP, Tórtola T, Mirelis B, Navarro G, Cuenca M, Esteve M, Peña C, Llanos AC, Cantón R, Pascual A.** *Escherichia coli* producing SHV-type extended-spectrum beta-lactamase is a significant cause of community-acquired infection. *J Antimicrob Chemother.* **2009**; 63: 781-4.

- Rodríguez-Baño J, Picón E, Gijón P, Hernández JR, Ruíz M, Peña C, Almela M, Almirante B, Grill F, Colomina J, Giménez M, Oliver A, Horcajada JP, Navarro G, Coloma A, Pascual A; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Community-onset bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis*. **2010**; 50: 40-8.
- Romero ED, Padilla TP, Hernández AH, Grande RP, Vázquez MF, García IG, García-Rodríguez JA, Muñoz Bellido JL. Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. producing multiple extended-spectrum beta-lactamases. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **2007**; 59: 433-7.
- Romero L, López L, Rodríguez-Baño J, Ramón Hernández J, Martínez-Martínez L, Pascual A. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*. **2005**; 11: 625-31.
- Rooney PJ, O'Leary MC, Loughrey AC, McCalmont M, Smyth B, Donaghy P, Badri M, Woodford N, Karisik E, Livermore DM. Nursing homes as a reservoir of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. **2009**; 64: 635-41.
- Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*. **2008**; 14 (Supl 1): 33-41.
- Ruiz E, Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Olarte I, Esteban I, Rocha-Gracia R, Zarazaga M, Torres C. Outbreak caused by a multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain of new sequence type ST341 carrying new genetic environments of *aac(6')-Ib-cr* and *qnrS1* genes in a neonatal intensive care unit in Spain. *Int J Med Microbiol*. **2010**; 300: 464-9.
- Sabaté M, Miró E, Navarro F, Vergés C, Aliaga R, Mirelis B, Prats G. Beta-lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). *J Antimicrob Chemother*. **2002a**; 49: 989-97.
- Sabaté M, Navarro F, Miró E, Campoy S, Mirelis B, Barbé J, Prats G. Novel complex *sul1*-type integron in *Escherichia coli* carrying *bla*(CTX-M-9). *Antimicrob Agents Chemother*. **2002b**; 46: 2656-61.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. **1989**. Cold Spring Harbor. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Samuelson Ø, Naseer U, Tofteland S, Skutlaberg DH, Onken A, Hjetland R, Sundsfjord A, Giske CG. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother*. **2009**; 63: 654-8.
- Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D, Carmeli Y. High levels of antimicrobial co-resistance among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. **2005**; 49: 2137-9.
- Shu JC, Chia JH, Kuo AJ, Su LH, Wu TL. A 7-year surveillance for ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at a university hospital in Taiwan: the increase of CTX-M-15 in the ICU. *Epidemiol Infect*. **2010**; 138: 253-63.
- Silva J, Aguilar C, Ayala G, Estrada MA, Garza-Ramos U, Lara-Lemus R, Ledezma L. TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. **2000**; 44: 997-1003.
- Simarro E, Navarro F, Ruiz J, Miró E, Gómez J, Mirelis B. Salmonella enterica serovar virchow with CTX-M-like beta-lactamase in Spain. *J Clin Microbiol*. **2000**; 38: 4676-8.
- Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, Perroux R, Cluzel R. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother*. **1987**; 20: 323-34.

- Smith CA, Baker EN.** Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Curr Drug Targets Infect Disord.* **2002**; 2: 143-60.
- Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P.** Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev Infect Dis.* **1988**; 10: 879-84.
- Sun Y, Zeng Z, Chen S, Ma J, He L, Liu Y, Deng Y, Lei T, Zhao J, Liu JH.** High prevalence of *bla* extended-spectrum beta(CTX-M)-lactamase genes in *Escherichia coli* isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China. *Clin Microbiol Infect.* **2009**. En prensa.
- Tartof SY, Solberg OD, Manges AR, Riley LW.** Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol.* **2005**; 43: 5860-4.
- Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, Jones RN, Baquero F, Cantón R.** Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis.* **2007**; 45: 1171-8.
- Tato M, Coque TM, Baquero F, Cantón R.** Dispersal of carbapenemase *bla*VIM-1 gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons and conjugative plasmids in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2010**; 54: 320-7.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* **1995**; 33: 2233-9.
- Threlfall EJ, Woodford N.** Plasmid profile typing and plasmid fingerprinting. *Methos Mol. Bio.* **1995**; 46:225-36
- Tian SF, Chen BY, Chu YZ, Wang S.** Prevalence of rectal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among elderly people in community settings in China. *Can J Microbiol.* **2008**; 54: 781-5.
- Toleman MA, Bennet D, Walsh TR.** ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century?. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2006**; 70: 296-316.
- Torres C, Zarazaga M.** BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2007**; 25 (Supl 2): 29-37.
- Tóth A, Damjanova I, Puskás E, Jánvári L, Farkas M, Dobák A, Böröcz K, Pászti J.** Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2010**; 29: 765-9.
- Turner SM, Chaudhuri RR, Jiang ZD, DuPont H, Gyles C, Penn CW, Pallen MJ, Henderson IR.** Phylogenetic comparisons reveal multiple acquisitions of the toxin genes by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of different evolutionary lineages. *J Clin Microbiol.* **2006**; 44: 4528-36.
- Valverde A, Coque TM, Sánchez-Moreno MP, Rollán A, Baquero F, Cantón R.** Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol.* **2004**; 42:4769-75.
- Valverde A, Cantón R, Galán JC, Nordmann P, Baquero F, Coque TM.** In117, an unusual In0-like class 1 integron containing CR1 and *bla*(CTX-M-2) and associated with a Tn21-like element. *Antimicrob Agents Chemother.* **2006**;50:799-802.
- Valverde A, Coque TM, García-San Miguel L, Baquero F, Cantón R.** Complex molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: a long-term perspective from a single institution in Madrid. *J Antimicrob Chemother.* **2008a**; 61: 64-72.
- Valverde A, Grill F, Coque TM, Pintado V, Baquero F, Cantón R, Cobo J.** High rate of intestinal colonization with extended-spectrum-beta-lactamase-producing

organisms in household contacts of infected community patients. *J Clin Microbiol.* **2008b**; 46: 2796-9.

**Valverde A, Cantón R, Garcillán-Barcia MP, Novais A, Galán JC, Alvarado A, de la Cruz F, Baquero F, Coque TM.** Spread of *bla*CTX-M-14 is mainly driven by IncK Plasmids Disseminated Among A (ST10), B1 (ST155/ST359) and D *Escherichia coli* Phylogroups in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**; 53: 5204-12.

**Vecoli C, Prevost FE, Ververis JJ, Medeiros AA, O'Leary GP Jr.** Comparison of polyacrylamide and agarose gel thin-layer isoelectric focusing for the characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **1983**; 24: 186-9.

**Velasco C, Rodríguez-Baño J, García L, Díaz P, Lupión C, Durán L, Pascual A.** Eradication of an extensive outbreak in a neonatal unit caused by two sequential *Klebsiella pneumoniae* clones harbouring related plasmids encoding an extended-spectrum beta-lactamase. *J Hosp Infect.* **2009**; 73: 157-63.

**Venezia RA, Scarano FJ, Preston KE, Steele LM, Root TP, Limberger R, Archinal W, Kacica MA.** Molecular epidemiology of an SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in enterobacteriaceae isolated from infants in a neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis.* **1995**; 21: 915-23.

**Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG, Casellas JM.** Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in South America. *Clin Microbiol Infect.* **2008**; 14 (Supl 1): 154-8.

**Vinué L, Sáenz Y, Martínez S, Somalo S, Moreno MA, Torres C, Zarazaga M.** Prevalence and diversity of extended-spectrum beta-lactamases in faecal *Escherichia coli* isolates from healthy humans in Spain. *Clin Microbiol Infect.* **2009**; 15: 954-7.

**Wachino J, Doi Y, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Kubota T, Arakawa Y.** Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A  $\beta$ -lactamase, GES-4, possessing a single G170S

substitution in the  $\Omega$ -loop. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**; 48: 2905-10.

**Wang H, Kelkar S, Wu W, Chen M, Quinn JP.** Clinical isolates of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases: prevalence of CTX-M-3 at a hospital in China. *Antimicrob Agents Chemother.* **2003**; 47: 790-3.

**Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* **1991**; 173: 697-703.

**Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N.** Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis.* **2001**; 15; 32 (Supl 2): S94-103.

**Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H, Achtman M.** Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol.* **2006**; 60: 1136-51.

**Woerther PL, Angebault C, Lescat M, Ruppé E, Skurnik D, Mniat AE, Clermont O, Jacquier H, Costa AD, Renard M, Bettinger RM, Epelboin L, Dupont C, Guillemot D, Rousset F, Arlet G, Denamur E, Djossou F, Andremont A.** Emergence and Dissemination of Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in the Community: Lessons from the Study of a Remote and Controlled Population. *J Infect Dis.* **2010**; 202: 515-23.

**Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J, Fagan EJ, James D, Johnson AP, Pike R, Warner M, Cheasty T, Pearson A, Harry S, Leach JB, Loughrey A, Lowes JA, Warren RE, Livermore DM.** Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* **2004**; 54: 735-43.

**Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ.** Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* **2006**; 57: 154-5.

**Woodford N, Kaufmann ME, Karisik E, Hartley JW.** Molecular epidemiology of multiresistant *Escherichia coli* isolates from community-onset urinary tract infections in Cornwall, England. *J Antimicrob Chemother.* **2007**; 59: 106-9.

**World Health Organization.** WHO fact sheet on antimicrobial resistance. **2002.** Fact sheet n° 194. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>

**Yurieva O, Kholodii G, Minakhin L, Gorlenko Z, Kalyaeva E, Mindlin E, Nikiforov V.** Intercontinental spread of promiscuous mercury-resistance transposons in environmental bacteria. *Mol Microbiol.* **1997**; 24: 321-9.





**ANEXOS**



## PUBLICACIONES ORIGINALES

1. **Valverde A**, Coque TM, Sanchez-Moreno MP, Rollan A, Baquero F, Canton R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. J Clin Microbiol. 2004; 42: 4769-75.

<http://jcm.asm.org/cgi/content/full/42/10/4769?view=long&pmid=15472339>

2. **Valverde A**, Canton R, Galan JC, Nordmann P, Baquero F, Coque TM. In117, an unusual In0-like class 1 integron containing CR1 and *bla*(CTX-M-2) and associated with a Tn21-like element. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50: 799-802.

<http://aac.asm.org/cgi/content/full/50/2/799?view=long&pmid=16436750>

3. **Valverde A**, Coque TM, García-San Miguel L, Baquero F, Cantón R. Complex molecular epidemiology of extended-spectrum -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: a long-term perspective from a single institution in Madrid. J Antimicrob Chemother. 2008; 61: 64-72. <http://jac.oxfordjournals.org/content/61/1/64.long>

4. **Valverde A**, Grill F, Coque TM, Pintado V, Baquero F, Cantón R, Cobo J. High rate of intestinal colonization with extended-spectrum-beta-lactamase-producing organisms in household contacts of infected community patients. J Clin Microbiol. 2008; 46: 2796-9.

<http://jcm.asm.org/cgi/content/full/46/8/2796?view=long&pmid=18562591>

5. **Valverde A**, Cantón R, Garcillán-Barcia MP, Novais A, Galán JC, Alvarado A, de la Cruz F, Baquero F, Coque TM. Spread of *bla*CTX-M-14 is mainly driven by IncK plasmids disseminated among A (ST10), B1 (ST155/ST359) and D *Escherichia coli* phylogroups in Spain. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53: 5204-12.

<http://aac.asm.org/cgi/content/full/53/12/5204?view=long&pmid=19786598>

6. Cantón R, **Valverde A**, Novais A, Baquero F, Coque T. Evolución y mapa actual de las beta-lactamasas de espectro extendido. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007; 25 (Supl 2): 2-10.

[http://www.elsevier.es/revistas/ctl\\_servlet?\\_f=7012&articuloid=13112082&revistaid=28](http://www.elsevier.es/revistas/ctl_servlet?_f=7012&articuloid=13112082&revistaid=28)

7. Cantón R, Novais A, **Valverde A**, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14 (Supl 1): 144-53.

8. Paniagua R, **Valverde A**, Coque TM, Baquero F, Cantón R. Assessment of prevalence and changing epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae fecal carriers using a chromogenic medium. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010; 67: 376-9.

[http://www.dmidjournal.com/article/S0732-8893\(10\)00118-5/](http://www.dmidjournal.com/article/S0732-8893(10)00118-5/)

